

GUSTAVO CAMPOS RAMOS

**ATIVIDADE IMUNO-INFLAMATÓRIA NO REPARO TECIDUAL DA LESÃO
CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL EM RATOS: IMPLICAÇÕES
E OPORTUNIDADES TERAPÊUTICAS**

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATIVIDADE IMUNO-INFLAMATÓRIA NO REPARO TECIDUAL DA LESÃO
CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL EM RATOS: IMPLICAÇÕES
E OPORTUNIDADES TERAPÊUTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

GUSTAVO CAMPOS RAMOS
FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

R175a Ramos, Gustavo Campos

Atividade imuno-inflamatória no reparo tecidual da lesão
cardíaca induzida por isoproterenol em ratos [tese] :
implicações e oportunidades terapêuticas / Gustavo Campos
Ramos ; orientador, Jamil Assreuy. - Florianópolis, SC, 2011.
99 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Rato como animal de laboratório.
3. Tolerância. 4. Enfarte do miocárdio. 5. Insuficiência
cardíaca. 6. Imunidade. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

CDU 615

“Fracassei em tudo o que tentei na vida [...] Mas os fracassos são minhas vitórias. Eu detestaria estar no lugar de quem me venceu”.

Darcy Ribeiro

Aos meus pais, que me deram muito mais que genes.

Agradecimentos

A minha família: aos que sempre caminharam comigo; aos que já não caminham mais ao meu lado, embora sua importância ainda permaneça; e a quem acabou de chegar, trazendo um sorriso espontâneo que tem transformado minha vida.

Ao professor Jamil pela amizade, orientação, e liberdade – uma postura de poucos que repercutiu muito.

Ao Kay e ao Jompoma, que além de grandes amigos, são minhas referências biológicas mais sólidas.

Ao grande amigo e professor Nelson Vaz, que nunca se colocou na posição de me ensinar nada e, no entanto, foi com quem aprendi tudo.

Aos colegas Vitor Pordeus, Archimedes Barbosa, Claudia Carvalho, João Francisco Botelho, Maria Noviello e aos colaboradores do blogger núcleo decênio, que compartilham comigo esse entusiasmo biológico e têm sido grandes “transformadores na convivência”.

Aos colegas de laboratório, por ajudar a criar um ambiente não competitivo e favorável ao crescimento pessoal e científico.

Aos amigos Lucas pé na estrada e a Soeur Muryel, companheiros de chão e solidão.

Às Doutoras Silvia dal Bó, Daniela Leite, Claudia Rocha Carvalho e Eliane Goldfeder, que contribuíram decisivamente com a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto e a Prof. Dra Evelise Nazari por disponibilizar equipamentos importantes para realização deste trabalho.

À Diretora do Centro de Ciências Biológicas, Prof. Dra Sônia Carobrez, a pessoa que efetivamente apoiou e incentivou todas as minhas tentativas de vôos além-tese.

Ao apoio financeiro da Capes, CNPq e FAPESC.

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Lesão e reparo cardíaco	2
1.2 Atividade imuno-inflamatória e a dicotomia regeneração/ cicatrização	5
1.3 Reparo de lesões miocárdicas e atividade auto-imune	7
1.4 Nem mecânico, nem sobrenatural	8
1.5 Tolerância oral	9
1.6 Proposta de trabalho	12
2 Objetivos	13
2.1 Metas	14
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Animais	16
3.2 Modelo experimental	16
3.3 Grupos experimentais	17
3.3.1 Preparo de extratos cardíacos	17
3.3.2 Protocolo de tolerância oral	18
3.3.3 Protocolo de imunização	18
3.4 Parâmetros avaliados	18
3.4.1 Parâmetros Imunológicos	18
3.4.1.1 Ensaio de proliferação celular	19
3.4.2 Parâmetros funcionais (Coração isolado e perfundido)	19
3.4.3 Análise morfológica	20
3.5 Análise estatística	21
4 Resultados	22
4.1 Características gerais do modelo experimental	23
4.2 Alterações na atividade imuno-inflamatória após lesão miocárdica	24
4.3 Proliferação de células coletadas dos linfonodos mediastinais	27
4.4 Efeitos da tolerância imunológica aos componentes cardíacos sobre a reconstituição tecidual pós-infarto	29
4.5 Abordagem morfológica	37
4.6 Efeitos da imunização contra epítomos cardíacos sobre o reparo e função cardíaca após injeção de isoproterenol	41
5 Discussão	44
5.1 Considerações sobre o modelo experimental	45
5.2 Considerações sobre a atividade immune-inflamatória pós-infarto miocárdico	46

5.2.1 Autoimunidade patogênica	48
5.2.2 Imunidade e função cardíaca	49
5.2.2 Imunidade e reparo tecidual cardíaco	52
5.3 Considerações sobre a tolerância imunológica	56
5.3.1 Tolerância oral	57
5.4 Perspectivas farmacológicas	58
5.5 Perspectivas Biológicas	60
6 Referências Bibliográficas	62

Lista de Figuras

Figura 1: Três fases da restituição tecidual após infarto agudo miocárdico	4
Figura 2 – A "tolerância oral"	10
Figura 3: Registro típico da resposta cardiovascular deflagrada pela injeção de isoproterenol (140 µmol/Kg, s.c.).	17
Figura 4: Alterações morfofuncionais observadas no modelo de lesão miocárdica induzida por isoproterenol.	25
Figura 5: Quantificação do peso úmido e celularidade de órgão linfóides em diferentes tempos após indução da lesão miocárdica	26
Figura 6: Resposta proliferativa de células obtidas a partir dos linfonodos mediastinais	28
Figura 7: Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de indução de tolerância sobre o desempenho cardíaco	32
Figura 8: Desempenho cardíaco avaliado através da preparação de Langendorff realizado 3 dias após a indução das lesões	34
Figura 9: Decurso temporal dos efeitos da tolerância aos componentes cardíacos sobre o desempenho de corações montados <i>ex vivo</i> em sistema de Langendorff	36
10: Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado leucocitário em corações coletados 3 dias após a injeção de isoproterenol	38
Figura 11: Avaliação da fração de área de colágeno em corações seccionados transversalmente e corados com picrosirius.	39
Figura 12: Consequências morfofuncionais da imunização contra componentes cardíacos realizada previamente ao infarto miocárdico	42
Figura 13: Obstáculos para a regeneração cardíaca	47
Figura 14: Componentes e relações	61

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Fármacos empregados no tratamento da falência cardíaca e suas ações no reparo tecidual

8

Lista de abreviaturas

+dT/dt	Derivada temporal da Tensão desenvolvida positiva (Velocidade de contração)
-dT/dt	Derivada temporal da Tensão desenvolvida negativa (Velocidade de relaxamento)
+dP/dt	Derivada temporal da Pressão desenvolvida positiva (Velocidade de contração)
-dP/dt	Derivada temporal da Pressão desenvolvida negativa (Velocidade de relaxamento)
PAM	Pressão arterial média
FC	Frequência cardíaca
ISO	Isoproterenol

Resumo

Estudos recentes da literatura têm sugerido que um episódio de infarto miocárdico agudo pode deflagrar a atividade de linfócitos reativos aos próprios tecidos cardíacos. Nesse contexto, é possível que uma autorreatividade imune-inflamatória pós-infarto tenha consequências prejudiciais ao reparo tecidual e função cardíaca. No presente trabalho foi investigado se um reforço na tolerância imunológica aos componentes cardíacos, promovido através da exposição destes componentes pela via oral, poderia modificar o curso do reparo tecidual cardíaco pós-infarto. Para tal, lesões miocárdicas tipo-infarto foram deflagradas por meio da administração de altas doses de isoproterenol (140 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), e o reparo tecidual foi observado morfológicamente por um período de até 60 dias. A funcionalidade cardíaca foi analisada através da técnica de órgão isolado e perfundido, e a atividade de células obtidas a partir dos linfonodos drenantes foi avaliada *in vitro*. A tolerância imunológica aos componentes cardíacos foi promovida pela administração oral de extrato cardíaco (20 mg de proteínas, 7 dias antes da administração de isoproterenol). Observou-se que após 14 dias da indução das lesões miocárdicas, linfócitos coletados a partir dos linfonodos mediastinais foram ativados *in vitro* com proteínas cardíacas, respondendo com proliferação celular. Em contraste, linfócitos obtidos dos linfonodos de animais não infartados ou de animais que receberam administração oral dos antígenos cardíacos previamente ao infarto não apresentaram resposta proliferativa decorrente do estímulo com antígenos cardíacos. Como consequência, animais tornados tolerantes ao tecido cardíaco seguiram um reparo tecidual pós-infarto com menor infiltrado leucocitário, menor deposição de colágeno e menor prejuízo motor. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que uma atividade autoimune patogênica toma parte nos fenômenos de reparo tecidual pós-infarto favorecendo eventos pró-fibróticos exacerbados e se correlacionando com maior prejuízo motor do coração. Ademais, esses eventos imunológicos direcionados ao próprio coração podem ser modificados por meio da ingestão prévia de componentes cardíacos propiciando um melhor reparo das lesões miocárdicas.

ABSTRACT

Following a myocardial infarction, lymphocytes infiltrate myocardial lesions. They may react with heart components and it has been suggested that that this may be disadvantageous to heart healing. In the present work we investigated whether ingestion of a crude rat heart extract tipping the balance in favor of oral tolerance, would modify the course of post-infarction myocardial repair. Infarction-like myocardial lesions were induced in Wistar rats by injection of high doses of isoproterenol. The healing process was accompanied morphologically and functionally for 60 days. Cardiac function was evaluated using isolated and perfused heart (Langendorff) preparation. At day 14 after isoproterenol, lymphocytes collected from mediastinal lymph nodes rates proliferated when exposed *in vitro* to myocardial extracts. In contrast, lymphocytes from rats receiving heart extract by gavage 7 days before isoproterenol, did not proliferate. Furthermore, gavaged rats presented a milder inflammatory infiltrate, less collagen deposition and improved cardiac performance when compared to animals that ingested saline before myocardial infarction. The present findings suggest that pathogenic autoimmune activity during cardiac infarction favors fibro-proliferative responses and loss of function. When this course of events is modified by interfering with natural tolerance to heart proteins, the healing process proceeds with less inflammation and fibrosis and better organ function.

1.1 Lesão e reparo cardíaco

O processo de geração e regeneração dos tecidos é um fenômeno central no viver saudável. Todavia, no caso de vertebrados adultos, o reparo de lesões teciduais, mesmo quando ocorre com máxima eficiência, se passa majoritariamente de maneira fibroproliferativa, *i.e.*, com formação de um tecido cicatricial. Desta maneira, os tecidos e órgãos lesionados são frequentemente reconstruídos com uma estrutura e organização diferente do tecido original, resultando em significativa perda de função, ao invés de uma completa regeneração (HARTY ET AL., 2003). O coração dos vertebrados é um exemplo de órgão que apresenta capacidade regenerativa mínima. Assim, na decorrência de uma lesão cardíaca, os processos de reparo tecidual não resultam no restabelecimento de um *status quo ante*, e frequentemente prejudicam a capacidade contrátil cardíaca (BUJAK E FRANGOIANNIS, 2006). Essa suposta incapacidade regenerativa cardíaca é ainda hoje uma importante fronteira médica a ser transposta, haja vista a assombrosa incidência de cardiomiopatias que acometem a população mundial: a incidência de infarto agudo do miocárdio na população norte-americana é de aproximadamente 1,5 milhões de pessoas por ano (FRANGOIANNIS, 2008).

Na decorrência de um infarto miocárdico – a forma mais comum de lesão cardíaca –, observa-se que a necrose de cardiomiócitos, juntamente com a hipóxia tecidual desencadeia uma intensa resposta inflamatória local aguda, com extensa liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais promovem um grande influxo de leucócitos para a área enfartada (FRANGOIANNIS, 2008). Este infiltrado leucocitário tem a importante função de degradação da matriz extracelular do tecido cardíaco, bem como a remoção de restos celulares necróticos. No entanto, como consequência desta mesma atividade imune-inflamatória, observa-se que durante a maturação da lesão, se forma um tecido cicatricial rico em feixes de colágeno de extensão que muitas vezes supera a área da lesão primária (ERTL E FRANTZ, 2005). Quando persistente, esta deposição de fibras colágenas pode provocar um remodelamento da parede ventricular, afetando negativamente a funcionalidade cardíaca e o prognóstico de pacientes infartados (PICK ET AL., 1989). Este remodelamento manifesta-se clinicamente através de dilatação das câmaras cardíacas, hipertrofia, aumento da esfericidade, perda na capacidade contrátil e diminuição no débito cardíaco. Toda esta situação está associada com a progressão da falência cardíaca, um

importante fator relacionado com altas taxas de mortalidade e morbidez em todo o mundo (FRANGOIANIS, 2008; MARSI E CHANDRASHEKHAR, 2008). Uma representação dos estágios de lesão e reparo do tecido cardíaco encontra-se ilustrada na Figura 1.

Do ponto de vista da fisiopatologia pós-infarto miocárdico, é importante mencionar que em momentos agudos o débito cardíaco é significativamente prejudicado. Essa redução na capacidade de trabalho cardíaco, bem como na perfusão dos tecidos periféricos resulta em um aumento compensatório no tônus simpático sobre o coração bem como na atividade do sistema renina-angiotensina. O maior tônus simpático promove um aumento na frequência cardíaca, enquanto que a atividade da angiotensina promove um maior acúmulo de líquidos no sistema vascular, aumentando a pré-carga, que por sua vez promove um aumento na fração de ejeção (MILL ET AL., 2001). Desta maneira, essas respostas neuroendócrinas são responsáveis por manter o débito cardíaco em níveis compatíveis com a vida.

No entanto, quando a lesão miocárdica é muito extensa e essas respostas simpática e renal se tornam persistentes, elas deixam de ser adaptativas e passam a contribuir drasticamente com o desenvolvimento do quadro de falência cardíaca. Isto ocorre porque, por um lado, a descarga simpática sobre o coração aumenta o consumo de O_2 , deprime as reservas de energia do músculo, e dificulta a perfusão do subendocárdio, aumentando a severidade das lesões. Por outro lado, uma atividade persistente do sistema renina angiotensina também parece ser deletério ao coração já que ao atuar em receptores AT_1 na membrana dos cardiomiócitos, a angiotensina II promove hipertrofia, um evento que está diretamente relacionado com as alterações anatômicas do coração que resultam em falência cardíaca após o infarto (MILL ET AL., 2001). Desta forma, o uso de beta-bloqueadores tem sido empregado na clínica com o intuito de se preservar a integridade dos cardiomiócitos; ao passo que o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina ou de antagonistas AT_1 tem sido empregado com o intuito de se prevenir o remodelamento das paredes ventriculares.

Nesse contexto referente às alternativas terapêuticas que minimizem o desenvolvimento da falência cardíaca pós-infarto miocárdico, ressalta-se que todas as práticas disponíveis atualmente concentram-se exclusivamente em modular aspectos da fisiologia dos cardiomiócitos ou em melhorar a função de “bomba” do coração, como estes mencionados anteriormente. No entanto, apesar de importantes avanços recentes no conhecimento de Farmacologia Cardiovascular,

não existe no momento nenhuma alternativa farmacológica que busque manejar um processo reparatório que seja menos restritivo à função cardíaca (ERTL E FRANTZ 2004).

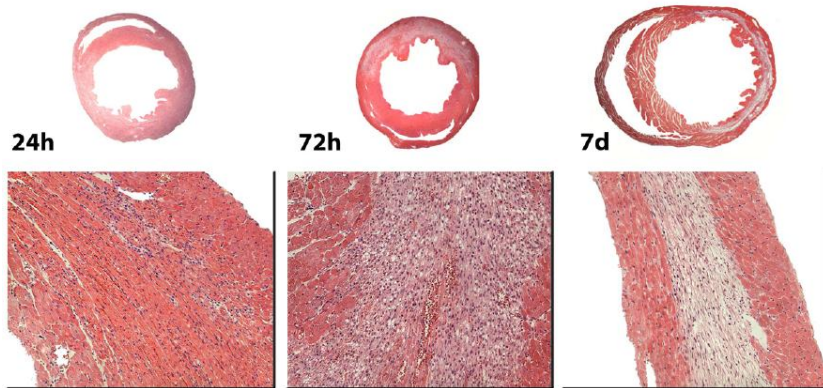


Figura 1: Três fases da restituição tecidual após infarto agudo miocárdico. Em momentos mais agudos o miocárdio apresenta sinais *inflamatórios* canônicos como o edema intercelular e o influxo de leucócitos. Essa resposta evolui com a formação de um tecido de granulação, a resolução da inflamação aguda e recomposição da matriz extracelular. Esses eventos caracterizam a fase de *fibrose*. Por fim, os processos de fibrose seguem uma maturação duradoura, com remodelamento da arquitetura das câmaras cardíacas, e possível aumento na esfericidade do coração (extraído de FRANGOIANIS, 2008).

Essa lacuna terapêutica se torna ainda mais séria quando se leva em consideração que, uma vez iniciado o infarto agudo miocárdico, a janela temporal para se recuperar a viabilidade de cardiomiócitos isquêmicos é muito restrita. Por outro lado, a janela temporal para uma intervenção sobre o processo de recomposição – inflamação e fibrose – é suficientemente grande (ERTL E FRANTZ 2004).

Uma justificativa para esse hiato terapêutico se deve à existência de um consenso de raízes muito remotas de que órgãos mais especializados e diferenciados, como o coração, são incapazes de se regenerar na vida adulta (KING, 1939). Desta forma a pergunta: “por que uma lesão cardíaca necessariamente evolui por meio de um processo fibrótico?” não parecia requerer maiores explicações. Assim, tentativas

de melhorar farmacologicamente esse reparo miocárdico pareceriam infrutíferas.

Nos últimos anos, contudo, esta antiga certeza sobre a ausência de poder regenerativo do coração tem sido questionada por duas linhas de evidências impressionantes: (1) a descoberta de populações de células progenitoras cardíacas endógenas multipotentes, capazes de se diferenciar nos principais tipos celulares encontrados no coração de roedores e humanos (KUBO ET AL., 2008; MESSINA, ET AL., 2004); e (2) a descoberta de modelos de animais capazes de realizar uma completa regeneração cardíaca sem formação de cicatriz ou sequelas sobre a função cardíaca, como o peixe-zebra (*Danio rerio*), (LEPILINA ET AL., 2006) e diversas espécies de salamandras (AUSONE E SARTORE, 2009).

Em conjunto, estes achados inauguraram promissoras perspectivas de que o reparo cardíaco em mamíferos pode ser melhor manejado e, eventualmente, que a regeneração cardíaca pode ser alcançada. Torna-se patente, desta forma, esclarecer justamente quais processos regulam esta dicotomia entre um reparo fibrótico/cicatricial que é deletério ao coração e um reparo regenerativo; ou seja, quais fatores restringem uma adequada reorganização cardíaca pós-lesão?

1.2 Atividade imuno-inflamatória e a dicotomia regeneração/cicatrização

Quando comparadas superficialmente, o reparo de lesões cardíacas parece ser muito distinto do reparo de lesões cutâneas. O tecido cardíaco apresenta um microambiente particular, um ritmo contrátil incessante que interfere com a dinâmica do reparo e diversas outras particularidades. Ainda assim, muitos autores têm recentemente procurado traçar alguns princípios mais gerais do processo de reparo tecidual, características que sejam comuns à reconstrução de qualquer tecido. Talvez a partir desse tipo de abordagem comparativa, seja possível aproveitar um pouco do conhecimento acerca do fechamento de lesões cutâneas, que é um campo que vem sendo empiricamente tratado pela medicina há muitos séculos, para melhor compreender o reparo cardíaco.

Ao menos no que se refere ao processo de reparo de lesões cutâneas, a literatura científica é bastante clara em demonstrar que uma resposta inflamatória local exacerbada conduz a um processo demasiadamente fibrótico. Estudos do grupo de Ferguson (*e.g.* MCCALLION E FERGUSON, 1995; WHITBY E FERGUSON, 1991)

explorando procedimentos cirúrgicos intrauterinos em fetos de mamíferos levaram a descoberta de que o reparo cutâneo em fetos ocorre sem formação de cicatriz, *i.e.*, por meio de uma regeneração completa. Neste contexto, cabe ressaltar que a característica mais proeminente do reparo cutâneo fetal é a total ausência de uma resposta inflamatória aguda, como é o caso das lesões observadas em adultos. Ademais, a indução de tal resposta inflamatória em fetos promove fibroplasia e deposição de colágeno, resultando em uma resposta cicatricial semelhante àquela ocorrida em adultos (FRANTZ ET AL., 1993). Por outro lado, camundongos imunodeficientes, mesmo quando adultos, são capazes de apresentar reparo cutâneo sem formação de tecido cicatricial (WHITBY E FERGUSON, 1991). Desta maneira, estes estudos indicam fortemente que o perfil da resposta inflamatória é um fator definatório na determinação da qualidade de um processo de reparo, ao menos no que diz respeito ao tecido cutâneo.

Quando essa mesma linha de pensamento é levada a outros tecidos e modelos animais, essa relação entre imunidade e regeneração parece ser muito mais generalizável. Animais que apresentam uma excepcional capacidade regenerativa, seja de tecidos cutâneos, seja do próprio tecido cardíaco, *e.g.* os anfíbios urodelos, tem como principal particularidade o fato de promover um reparo de lesões na ausência de resposta inflamatória proeminente (MESCHER E NEFF, 2006). Ainda tratando-se de anfíbios, essa relação entre imunidade e regeneração também pode ser contemplada em animais anuros, como o sapo *Xenopus leavis*. Nestes animais, a capacidade de regenerar membros amputados é mantida somente durante a vida larval e é gradativamente perdida à medida que o sistema imunológico e o timo se desenvolvem e amadurecem (MESCHER E NEFF, 2006).

Tendo em vista essas observações, alguns autores têm sugerido que o desenvolvimento de uma atividade imunológica específica é responsável pela perda na capacidade dos diversos animais adultos regenerarem órgãos complexos, como o coração (HARTY, ET AL., 2002; SICARD, 2002).

Essa é uma ideia relevante a ser testada no contexto cardíaco, buscando-se compreender porque esse tecido apresenta capacidade regenerativa tão reduzida. No que se refere ao reparo de lesões cardíacas em mamíferos, essa relação entre imunidade/regeneração ainda foi muito pouco explorada até o momento. Ressalta-se também que alguns trabalhos têm indicado que aspectos da atividade imunológica desenvolvida após o infarto miocárdico podem prejudicar

diretamente a funcionalidade cardíaca, equivalente à outros relatos em contextos não-cardíacos (LIAO E CHENG, 2006; YU, ET AL., 2005).

1.3 Reparo de lesões miocárdicas e atividade auto-imune

Em decorrência de uma isquemia miocárdica, a necrose de cardiomiócitos resulta na liberação de moléculas intracelulares para o compartimento extracelular. Além disso, essa exposição de epítomos até então confinados no ambiente citoplasmático dos cardiomiócitos acaba acontecendo em um contexto tecidual necrótico e inflamatório. Esse microambiente “inflamado” é particularmente favorável à ativação e ao desenvolvimento de uma atividade com proliferação progressiva de linfócitos (MATZINGER, 2007).

Assim, eventos autoimunes parecem tomar parte nos acontecimentos de reparo de lesões miocárdicas isquêmicas. Evidências antigas, das décadas de 60 e 70 demonstram claramente a presença de auto-anticorpos para proteínas intracelulares cardíacas no sangue de pacientes humanos infartados (LESSOF, 1978). Melguizo et al. (1997) identificaram que 44% de um total de 66 pacientes com infarto miocárdico apresentaram anticorpos reativos à tropomiosina e actina cardíacas durante os três meses subsequentes à lesão, e que os títulos desses anticorpos correlacionou-se com os escores clínicos.

Adicionalmente, Pang et al. (2000) acompanharam a produção de anticorpos contra a miosina de cadeia pesada em 67 pacientes com infarto agudo miocárdico. Nesse estudo, os autores encontraram que as taxas de mortalidade, remodelamento e aneurisma ventricular foram significativamente maiores no grupo de pacientes que produziram autoanticorpos do que no grupo de pacientes que não produziram.

Maisel et al. (1999) demonstraram que a transferência adotiva de esplenócitos obtidos a partir de animais infartados em animais naïve singênicos foi capaz de promover miocardite autoimune e disfunção contrátil do miocárdio. Esses experimentos citados são de especial interesse, pois sugerem fortemente um viés autoimune nos fenômenos pós-infarto miocárdico, um aspecto até então negligenciado.

Alguns trabalhos demonstram ainda que, em um modelo murino de infarto miocárdico, foi observado a proliferação de linfócitos T autoreativos, e que esses linfócitos são capazes de promover necrose de mais cardiomiócitos (VARDA-BLOOM, ET AL. 2000).

Uma reavaliação mais cuidadosa acerca dos fármacos utilizados no tratamento do remodelamento cardíaco mostra que, muito além de interferir com a fisiologia cardiovascular, eles também interferem significativamente com eventos imune-inflamatórios, como exposto na Tabela 1. Contudo, apesar de essa íntima relação entre imunidade e restituição miocárdica parecer um tema relevante, ainda há um grande hiato no conhecimento científico atual acerca dessa relação.

Tabela 1 – Fármacos empregados no tratamento da falência cardíaca e suas ações no reparo tecidual (Adaptado a partir de ERTL E FRANTZ, 2005).

	Remodelamento	Citocinas	Fibrose	Leucócitos
Inibidores da ECA	Protetor (dados clínicos)	Reduz expressão	Reduz deposição de colágeno	Reduz infiltrado leucocitário
Antagonistas AT1	Protetor (dados clínicos)	Expressão reduzida em animais AT1 KO	Reduz deposição de colágeno	Reduz infiltrado leucocitário
Antagonistas β-adrenérgicos	Protetor (dados clínicos)	Reduz expressão	Reduz deposição de colágeno	Reduz infiltrado leucocitário
Estatinas	Protetor (dados clínicos)	Reduz expressão	Reduz deposição de colágeno	Reduz infiltrado leucocitário

1.4 Nem mecânico, nem sobrenatural

O cenário exposto até aqui pode fazer pensar que, a fim de se alcançar a regeneração, a atividade imuno-inflamatória deveria ser então um fator a ser excluído do reparo de lesões. Porém é preciso chamar

atenção que esse entrelaçamento da atividade imunológica com a reconstrução dos organismos tem mais nuances do que pode parecer a primeira vista.

Se, por um lado, a presença exacerbada, persistente, ou mal-direcionada de eventos imune-inflamatórios é um fator limitante à restituição miocárdica adequada (LIAO E CHENG, 2006) ou à regeneração da pata de uma salamandra (MESCHER E NEFF 2002); por outro lado, é evidente que diversos eventos inflamatórios são fundamentais ao reparo, de modo que sem estes eventos reparo algum acontece. Inflamação é parte indissociável da reconstrução de organismos. Assim do mesmo modo como ela pode ser restritiva ao reparo, a inibição indiscriminada da atividade imuno-inflamatória pós-infarto miocárdico, *e.g.* com o emprego de altas doses de glicocorticóides ou ciclofosfamida, é extremamente prejudicial e não permite sequer a formação de um tecido cicatricial (KLONER ET AL., 1978).

Neste delicado equilíbrio, a única certeza é a de que mais estudos acerca da relação imunidade/reparo cardíaco são necessários. Nesse contexto, muitos autores têm proposto desenvolver terapias anti-citocinas específicas, de modo a inibir apenas alguns aspectos da atividade imunológica pós-infarto (YU, ET AL., 2005).

Acreditamos, no entanto, que uma segunda linha possível de se abordar esse problema seja buscando-se desenvolver (ou reforçar) a tolerância imunológica aos componentes imunogênicos do miocárdio antes do desenvolvimento da patogênese autoimune observada no período pós-infarto. Uma estabilização da atividade imunológica – a tolerância – pode ser alcançada em animais adultos através do contato com antígenos através da mucosa oral (HANSON ET AL., 1977).

1.5 Tolerância oral

A tolerância oral é frequentemente definida como uma supressão da atividade imunológica contra antígenos que foram contatados inicialmente pela via oral. Virtualmente, qualquer manifestação imune-específica pode ser modificada através desse fenômeno. O leque vai desde respostas avaliadas *in vivo*, como hipersensibilidade do tipo tardia, formação de imunoglobulinas, até parâmetros aferidos *ex vivo*, como a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas (FARIA E WEINER, 2005).

A fenomenologia da tolerância oral revela-se da seguinte maneira: se um animal ingeriu ou recebeu por uma sonda gástrica (gavagem) um antígeno que ele não havia contado antes, ele responderá com menos intensidade à imunização (subcutânea, intraperitoneal, etc.) subsequente com o mesmo antígeno (em adjuvantes), quando comparados a animais-controle que não ingeriram o antígeno. Uma representação ilustrativa acerca desse fenômeno encontra-se ilustrada na Figura 2 (VAZ ET AL., 1977; VERDOLIN, ET AL., 2001; RAMOS ET AL., 2009).

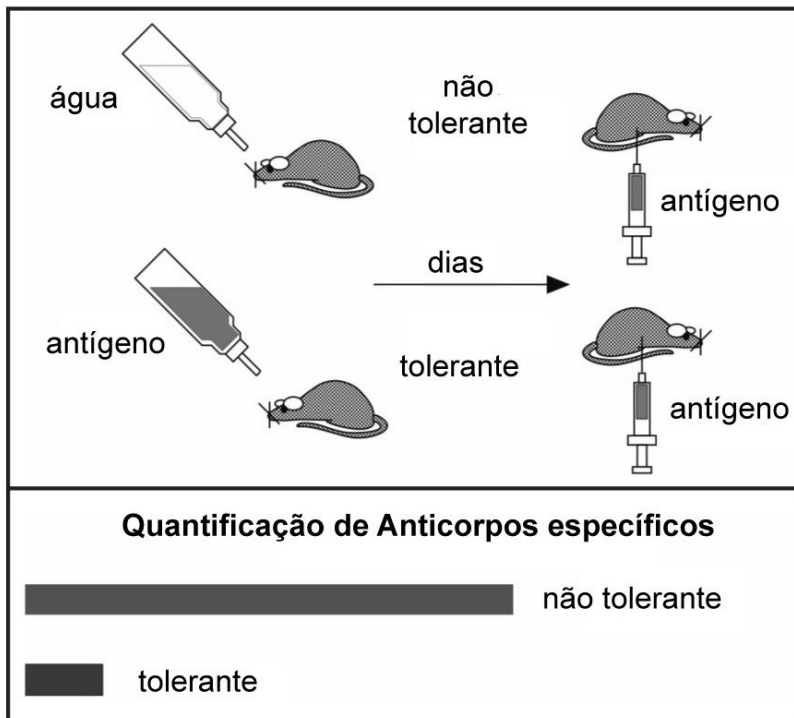


Figura 2 – A "tolerância oral". Animais jovens que ingeriram uma dada proteína podem desenvolver refratariedade à formação de anticorpos, se subsequentemente forem imunizados com a mesma proteína por via parenteral (por ex., intraperitoneal com adjuvantes) (extraído de VAZ E FARIA, 1993).

Diversos mecanismos celulares e moleculares já foram propostos para explicar como os materiais cujo contato foi feito pela rota oral são incorporados ao sistema imunológico sem deflagrar respostas progressivas. Alguns autores têm proposto como mecanismo a deleção de células T específicas para o antígeno tolerado, indução de anergia, ou ainda supressão por células T regulatórias. Sabe-se, por exemplo, que o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) tem sido apontado como molécula central nesse fenômeno que é dependente do particular contexto dos órgãos linfóides associados à mucosa (MOWAT, 2003). No entanto essa é ainda uma área pouco estudada na imunologia, devido ao fato de ter sido historicamente pouco explorada. Dependendo da dose do antígeno administrada, da linhagem de animal estudado, ou do modelo experimental abordado, as particularidades moleculares variam enormemente (FARIA e WEINER, 2005). Por esta razão, na sequência não serão fornecidos mais detalhes ainda confusos sobre a dinâmica molecular da tolerância oral. Ao invés disso, serão apresentados os dados da literatura importantes para revelar o operar desse fenômeno.

A tolerância oral não pode ser induzida em animais neonatos ou senis, pois demanda a presença de um sistema imunológico plenamente desenvolvido (VAZ, ET AL., 1997). Além disso, a tolerância oral pode ser transferida de um animal tolerante para um animal “virgem” através da adoção de células esplênicas, ou mesmo do soro (CUNHA, ET AL., 2009). Esses dados sugerem fortemente que a tolerância oral não é uma “subtração” (ausência de resposta por ignorância do sistema), como se imagina ser a tolerância a aloenxertos, por exemplo. Por requerer um sistema em plena atividade, a tolerância oral deve ser entendida mais como uma adição, um acréscimo, que uma subtração na reatividade.

Não sendo uma simples negação protelada, como entender então a tolerância oral? Dados de Verdolin, et al (2001) sugerem que esse fenômeno pode ser descrito nos termos de estabilização da atividade imunológica. Dependendo da dose administrada oralmente, a supressão da resposta a exposição parenteral do antígeno é reduzida a diferentes patamares. Eventualmente as respostas são completamente abolidas, mas eventualmente são quase mantidas inalterada, caso a dose de antígeno ingerida seja suficientemente baixa. Acontece, porém, que quando animais tornados “parcialmente tolerantes” são novamente expostos a subseqüentes desafios com o antígeno (*boost*), não se observa um aumento progressivo da resposta, como aconteceria no caso da imunização. Dito de outra maneira, animais tolerantes não

apresentam aquilo que se chama “memória” imunológica. Assim, a principal diferença entre tolerância e imunidade não seria ausência ou presença de resposta, mas a estabilização de um patamar de atividade (VERDOLIN ET AL., 2001). Nelson Vaz tem feito um grande esforço para chamar atenção que a principal diferença entre tolerância e imunização é a conservação de um modo de operar estável, que não reage progressivamente a cada novo encontro (*e.g.* VAZ ET AL., 2006).

Devido a suas características, a tolerância oral já foi demonstrada ter importantes implicações terapêuticas. Diversos estudos têm demonstrado a eficácia de tratamentos orais com auto-antígenos em condições autoimunes experimentais e distúrbios inflamatórios (revisado por FARIA E WEINER, 2005). Situações como a encefalomielite alérgica experimental, artrites, diabetes autoimune, colite, uveíte autoimune experimental, alergias, asma, sensibilidade ao níquel, tireoidite, hipersensibilidade alimentar, aterosclerose e derrame já se mostraram amenizadas pelo tratamento oral com os antígenos responsáveis previamente à indução da enfermidade (FARIA E WEINER, 2005).

1.6 Proposta de trabalho

Com base no que foi exposto, acreditamos a indução de tolerância imunológica aos componentes cardíacos expostos no contexto da lesão miocárdica, por meio de um contato prévio dessas proteínas através da via oral, possa ter importantes consequências sobre a atividade imunológica pós-infarto miocárdico. Considerando que essa atividade é um fator determinante na qualidade do reparo tecidual em diversos modelos experimentais, nossa hipótese é que esse procedimento possa promover um reparo do miocárdio que seja menos restritivo à função cardíaca.

Nossos objetivos no presente trabalho são: (1) esclarecer em maior detalhe quais processos imune-inflamatórios regulam a dicotomia entre um reparo excessivamente cicatricial, que é deletério ao coração, e um reparo regenerativo, sem prejuízos ao débito cardíaco; e (2) compreender melhor se a indução de tolerância imunológica à antígenos cardíacos, através de protocolos padronizados de tolerância oral, pode promover um reparo cardíaco com mínimo prejuízo funcional.

2.1 Metas

- Caracterizar melhor algumas das alterações na atividade imunológica pós-infarto em ensaios de proliferação celular *in vitro*;
- Caracterizar melhor algumas das alterações na funcionalidade cardíaca observadas no modelo de infarto miocárdico induzido por isoproterenol, usando-se a preparação de coração isolado e perfundido;
- Verificar de que maneira manipulações experimentais da atividade imunológica direcionada ao tecido cardíaco que surge após o infarto miocárdico influenciam os processos de restituição tecidual.
- Explorar qual o melhor protocolo experimental para se promover um reforço da tolerância imunológica natural ao tecido cardíaco;
- Verificar quais as consequências do desenvolvimento de uma tolerância imunológica para componentes cardíacos sobre o prejuízo funcional e observado durante o período pós-infarto;

3.1 Animais

No presente estudo, foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 h, com acesso à água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram executados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais desta Instituição (Protocolo 083/CEUA/PRPE/2009).

3.2 Modelo experimental

Com o intuito de se estudar o processo de reparo tecidual no músculo cardíaco, lesões miocárdicas foram induzidas nos animais através da administração de isoproterenol ($140 \mu\text{mol/Kg}$, s.c.) por dois dias consecutivos, de acordo com o modelo previamente estabelecido por Rona et al., (1959). Nessa faixa de dose, o isoproterenol promove uma queda sustentada na pressão arterial média (PAM) concomitante com um aumento na frequência cardíaca (FC). A diferença entre demanda e a oferta de oxigênio promove uma lesão miocárdica isquêmica com características semelhantes ao infarto do miocárdio (RONA ET AL., 1959). Um registro típico exemplificando as alterações na pressão arterial e frequência cardíaca em um animal que recebeu esta dose de isoproterenol encontra-se apresentado na Figura 3.

Após a indução da lesão, aspectos morfofuncionais cardíacos e da atividade imuno-inflamatória destes animais foram acompanhados por um período de até 60 dias.

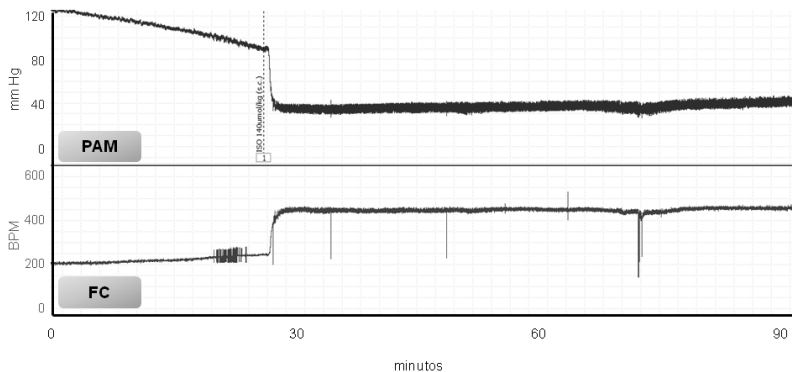


Figura 3: Registro típico da resposta cardiovascular deflagrada pela injeção de isoproterenol (140 $\mu\text{mol/Kg}$, s.c.). Observa-se uma redução substancial e sustentada na pressão arterial média (PAM), concomitante com um significativo aumento na frequência cardíaca (FC). A linha tracejada indica o momento em que o fármaco foi administrado. Esses resultados ilustram, ao menos em parte, os motivos pelos quais a administração do agonista- β nessas doses promove uma lesão isquêmica no miocárdio de ratos.

3.3 Grupos experimentais

O presente estudo contou com quatro grupos experimentais: um composto de animais sem qualquer manipulação (*naïve* ou controle; CTR); um grupo de animais submetidos à lesão cardíaca induzida por isoproterenol (ISO); um grupo de animais submetidos ao protocolo de tolerância oral a antígenos cardíacos sete dias antes da indução da lesão (TOL + ISO); e um grupo de animais submetidos ao protocolo de imunização contra componentes cardíacos previamente à indução da lesão (IM + ISO). Tolerância e imunização foram desenvolvidos utilizando-se um extrato com proteínas cardíacas, conforme descrito na sequência.

3.3.1 Preparo de extratos cardíacos

Corações de animais normais foram coletados, os ventrículos foram separados e picados em solução de Hanks resfriada a 4° C, e depois homogeneizados mecanicamente, conforme previamente descrito na literatura (TOOD, ET AL., 1983). Em seguida, esta solução foi congelada e descongelada por três vezes em nitrogênio líquido, e depois centrifugada a 1000 x g por 15 minutos. A concentração de proteínas

presentes no sobrenadante deste extrato cardíaco foi quantificada através da técnica de Bradford e ajustada para ser administrada conforme o interesse.

Este mesmo extrato de proteínas cardíacas foi empregado em três situações experimentais distintas: 1) para o tratamento oral e indução de tolerância imunológica; 2) para a imunização em adjuvantes; e 3) para o estímulo de linfócitos em cultura. Neste último caso, quando os extratos ventriculares eram preparados com o intuito de serem utilizados em experimentos em cultura celular, todo o procedimento descrito foi conduzido sob condições de esterilidade, no fluxo laminar.

3.3.2 Protocolo de tolerância oral

Com o intuito de se reforçar a tolerância natural aos b componentes cardíacos por meio do processo de tolerância oral, animais receberam uma única administração oral desta solução de extrato cardíaco contendo 20 mg de proteínas totais (em um volume de 250 µl), 7 dias antes da indução da lesão cardíaca com isoproterenol. A escolha dessa dose de proteínas cardíacas totais foi baseada em trabalhos prévios que promoviam tolerância oral à ovalbumina (CARVALHO, ET AL., 1994; 1996; 1997; VERDOLIN, ET AL., 2001; RAMOS ET AL., 2009).

Experimentos em que a dose ou o tempo de administração do extrato utilizado foram diferentes deste protocolo padrão encontram-se devidamente assinalados quando abordados na seção de Resultados.

3.3.3 Protocolo de imunização

Com o intuito de se promover atividade de linfócitos reativos aos epitopos cardíacos já previamente ao infarto miocárdico, animais foram imunizados com extratos cardíacos em adjuvantes 14 dias antes da injeção de isoproterenol. Para tal, animais receberam uma injeção intraperitoneal contendo 1 mg de proteínas cardíacas diluídas em 100 µl de adjuvante completo de Freund (Sigma).

3.4 Parâmetros avaliados

3.4.1 Parâmetros Imunológicos

Em diferentes períodos após a indução da lesão cardíaca (1-60 dias), animais foram sacrificados por decapitação e os linfonodos mediastinais, baço e timo foram dissecados e rapidamente coletados em solução de Hanks resfriada a 4° C. O peso úmido dos órgãos foi aferido e depois relativizado pelo peso total de cada animal (g/Kg). Posteriormente, os diferentes tecidos linfóides foram macerados em

meio RPMI contra um filtro de nylon para obtenção de suspensão de células liberadas do estroma dos linfonodos. Esta suspensão de células foi centrifugada (1000 x g, 10 min), depois suspensa em meio de cultura RPMI. O número total de células recuperadas dos tecidos por este procedimento foi quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.4.1.1 Ensaio de proliferação celular

Para se estudar a atividade imunológica desencadeada pela lesão miocárdica, no décimo quarto dia após o infarto, as células dos linfonodos mediastinais foram coletadas conforme descrito na seção anterior (em condições estéreis). Posteriormente, essas células foram mantidas em placas de cultura de 96 poços (10^7 células por poço) em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, essas células foram desafiadas em cultura com extratos cardíacos (obtidos conforme detalhado anteriormente) em concentrações de proteína que variaram entre 0,03 µg/ml até 3 µg/ml. Faltando 18 horas para completar 5 dias de cultura celular, adicionou-se $[H]^3$ -timidina (0,5 µCi/ml) em cada poço e a proliferação celular foi inferida a partir da incorporação de timidina marcada, quantificada por cintilação líquida. Como controle positivo deste ensaio, linfócitos foram estimulados com o mitógeno inespecífico concanavalina A (5 µg/ml), e como controle negativo, as utilizou-se ovalbumina, um antígeno T-dependente para o qual os animais não haviam sido sensibilizados. O índice de proliferação para cada ponto da curva foi deduzido pela razão entre leitura obtida para um ponto estimulado dividida pela leitura obtida para um ponto mantido sem estímulo, do mesmo animal.

3.4.2 Parâmetros funcionais (Coração isolado e perfundido)

O desempenho cardíaco dos animais dos diferentes grupos foi avaliado através da técnica de órgão isolado e perfundido (Langendorff), de acordo com (SKRZYPIEC-SPRING, et al., 2007). Para tal, animais de todos os grupos experimentais receberam uma injeção intraperitoneal de heparina (200 UI) e dez minutos após, foram sacrificados por decapitação, exsanguinados e toracotomizados, retirando-se o coração em bloco (juntamente com tecidos adjacentes), o qual foi colocado em um recipiente contendo solução de Krebs-Ringer a 4° C, sob oxigenação. Os tecidos adjacentes foram removidos e a aorta foi seccionada antes do arco aórtico e acoplada a uma agulha de aço inoxidável inserida em seu interior. A agulha (já com o coração nela amarrado) foi conectada ao sistema de perfusão e, através do qual o

coração recebeu um fluxo constante de 4 ml/min de Krebs-Ringer, previamente aerado com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). O registro da força de contração cardíaca foi mensurado com transdutores específicos acoplados ao órgão e ao sistema (transdutor de força modelo FT-03; Grass Instrument Co., West Warwick, RI, EUA). Em uma série independente de experimentos, um balão acoplado a um transdutor de pressão (Mikro-Tip[®], Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, EUA) foi inserido dentro do ventrículo esquerdo, através da valva mitral e a pressão intraventricular durante o ciclo cardíaco foi mensurada. Nesses experimentos, o fluxo de solução nutritiva foi mantido em 8 ml/min. Para os experimentos de aquisição de tensão, os corações foram mantidos durante todo o experimento sob pré-carga de tensão de 1 g, ao passo que passa os experimentos com balão intraventricular utilizou-se uma pré-carga de 10 mmHg de pressão.

Os registros foram captados em polígrafo computadorizado (Powerlab 8/30, AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália) com software de integração especial (Chart 7[®]) do mesmo fabricante.

A frequência cardíaca (em batimentos por minuto) e as derivadas da tensão, velocidade de contração (dT/dt+, em g/s), velocidade de relaxamento (dT/dt-, em g/s) foram calculadas a partir da onda de tensão sistólica. As derivadas temporais da pressão (dP/dt+ e dP/dt-, em mmHg/s), e a duração do ciclo (s) foram derivadas a partir do sinal de pressão intraventricular.

A solução de Krebs-Ringer tem a seguinte composição (concentrações em mM): NaCl (118,4), KCl (4,7), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄.7H₂O (1,2), CaCl₂.2H₂O (2,5), dextrose anidra (glicose) (11,7), NaHCO₃ (26,5).

3.4.3 Análise morfológica

Em diferentes períodos após a indução da lesão miocárdica, animais dos três grupos experimentais foram sacrificados, seus corações foram rapidamente coletados em solução salina resfriada a 4° C e então fixadas em formalina 10% (por 24 hs). Após inclusão em parafina, foram preparadas lâminas histológicas de coração em secção coronal ou transversal (5 µm), conforme interesse.

Para uma abordagem inicial e mais panorâmica acerca das características gerais do modelo experimental utilizado, os corações foram avaliados em cortes coronais, utilizando-se coloração de hematoxilina-eosina e picrosirius. No entanto, uma vez definido o melhor período para cada análise desejada, lâminas histológicas de

corações dos diferentes grupos foram montadas em cortes transversal medial, que permitia uma análise melhor padronizada.

Para a mensuração do infiltrado leucocitário, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e então analisados de maneira semi-quantitativa. Para tal, um total de dez campos (magnitude de 400x) por região anatômica de interesse foram analisados por dois experimentadores cegos aos grupos experimentais, que classificavam o infiltrado segundo os seguintes critérios: ausente (0), pouco (1), moderado (2) ou intenso (3). As regiões do miocárdio em secção transversal analisadas foram subendocárdica, miocárdio medial, e subepicárdica.

Por sua vez, a fibrose foi quantificada a partir de micrografias tomadas de secções cardíacas coradas com picrosirius (PICK, ET AL, 2008). Para cada amostra, um total de 10 micrografias do ventrículo esquerdo (VE) e 5 micrografias do ventrículo direito (VD) foram adquiridas e posteriormente analisadas com auxílio do programa Image J (NIH, EUA). A fração de área corada foi expressa como porcentagem em relação à área total do corte e foi inferida como estimativa de processo fibrótico.

3.5 Análise estatística

Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de um número (n) de animais que variou entre 5 e 21 animais por grupo, de acordo com o parâmetro medido. A análise estatística variou conforme as características da amostra e encontra-se devidamente indicada nas legendas de cada Figura.

4.1 Características gerais do modelo experimental

A administração de altas doses de isoproterenol (140 $\mu\text{mol/Kg}$, s.c.) induziu lesões miocárdicas, majoritariamente localizadas no ápice do ventrículo esquerdo, mas ocasionalmente também no ventrículo direito. Histologicamente, estas lesões apresentavam-se de maneira focal, porém algumas coalescentes, e eram caracterizadas por edema intersticial e intracelular; bem como pela lise de miofibrilas. Em momentos mais agudos após a administração de isoproterenol encontrou-se caracteristicamente um pronunciado infiltrado leucocitário mononuclear que se distribuíra conjuntamente às lesões do tecido (Figura 4A, $P < 0,05$ entre os grupos CTR e ISO nos períodos de 1, 3 e 7 dias após isoproterenol).

As lesões miocárdicas e o processo inflamatório decorrente delas foram seguidos por eventos fibroproliferativos, que neste trabalho foram quantificados a partir da análise de micrografias de cortes corados com picosírius (Figura 4B). Quando comparados aos órgãos coletados de animais controle, corações de animais injetados com isoproterenol apresentavam uma extensa deposição de colágeno fibrilar a qual pôde ser observada a partir do sétimo dia após as injeções de isoproterenol. Este processo se mostrou progressivo durante todo o período analisado, de modo que no 60º dia de estudo, a fração de área corada positivamente para colágeno em miocárdios de animais infartados foi de $19,2 \pm 3,0\%$, contra apenas $3,4 \pm 0,3\%$ em animais controle ($P < 0,05$).

Adicionalmente, a atividade plasmática da enzima lactato desidrogenase (LDH), um marcador de lise celular, encontrou-se significativamente aumentada 12 horas após a administração de isoproterenol quando comparada à atividade padrão de animais controle (atividade grupo controle $72,1 \pm 7,6$ U/l; atividade grupo lesão $206,5 \pm 52,1$ U/l, $P < 0,05$; Figura 4C).

Ainda no que diz respeito à caracterização geral do modelo de lesão cardíaca utilizado neste trabalho, cabe ressaltar que as alterações morfológicas descritas cursaram em conjunto a importantes disfunções contráteis do coração (Figura 4D). Utilizando-se o desenvolvimento de tensão pelo ventrículo esquerdo de corações montados em um sistema de órgão isolado e perfundido como um parâmetro da funcionalidade cardíaca, verificou-se que a administração de isoproterenol induziu um prejuízo motor agudo (entre 1 e 7 dias), o qual foi compensado após 14 dias da lesão. Nos momentos mais tardios (60 dias), todavia, prejuízos

na contratilidade cardíaca puderam ser novamente observados (tensão desenvolvida em grupo controle $4,4 \pm 0,2$ g; grupo lesão 3 dias $= 1,93 \pm 0,23$ g; grupo lesão 60 dias $2,4 \pm 0,39$ g , $P < 0,05$ comparado ao grupo controle).

4.2 Alterações na atividade imuno-inflamatória após lesão miocárdica

Com o intuito de acompanhar alterações imunológicas sistêmicas em decorrência da lesão cardíaca, o baço, timo e os linfonodos mediastinais (drenantes) foram coletados e pesados. Além disso, o número de células obtidas a partir da maceração destes órgãos estes foi quantificado (Figura 5).

Inicialmente, observou-se que os linfonodos mediastinais coletados de animais injetados com isoproterenol apresentavam peso e celularidade aumentados, quando comparados aos órgãos de animais controle. De especial interesse, observou-se que o aumento na celularidade nos linfonodos drenantes atingiu valor máximo 14 dias após a indução do infarto miocárdico (Figura 5A; linfonodos mediastinais grupo controle $3,5 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$ células/órgão; grupo lesionado 14 dias $8,2 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$ células/órgão; $P < 0,05$). A variação de peso úmido destes linfonodos corrigido pelo peso dos animais após a indução do infarto miocárdico apresentou uma cinética similar às variações de celularidade neste órgão (Figura 5B).

Diferentemente dos linfonodos drenantes, o baço coletado de animais infartados não apresentou alterações significativas tanto no peso quanto na celularidade em nenhum dos períodos que sucederam a indução do infarto miocárdico (Figura 5C e 5D). Por fim, ressalta-se que o timo apresentou uma significativa redução de peso e celularidade em momentos agudos (1-3 dias) após a administração de isoproterenol (Figuras 5E e 5F; grupo controle $5,6 \times 10^8 \pm 0,5 \times 10^8$ células/órgão; grupo lesão 3 dias $2,2 \times 10^8 \pm 0,18 \times 10^8$ células/órgão; $P < 0,05$).

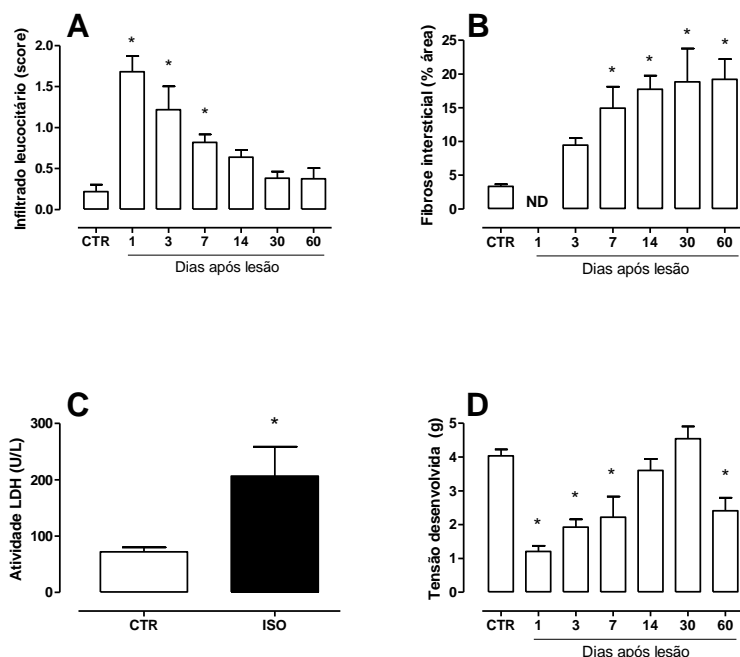


Figura 4: Alterações morfofuncionais observadas no modelo de lesão miocárdica induzida por isoproterenol. **Painel A:** Decurso temporal da intensidade do infiltrado inflamatório encontrado nos corações em secção coronal de animais controle (CTR) e lesionados (ISO). **Painel B:** Decurso temporal da fração de área de colágeno fibrilar depositado nos corações, analisados em secção coronal de corações de animais controle e lesionados com isoproterenol. **Painel C:** Atividade plasmática da enzima lactato desidrogenase (LDH) 12 horas após a segunda injeção de isoproterenol. **Painel D:** Decurso temporal das alterações na função ventricular inferida através do desenvolvimento de tensão durante a contração de corações montados *ex vivo*, em sistema de órgão isolado e perfundido. A análise estatística utilizada foi ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnet, exceto Painel C, analisado através de teste t de Student. O símbolo * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

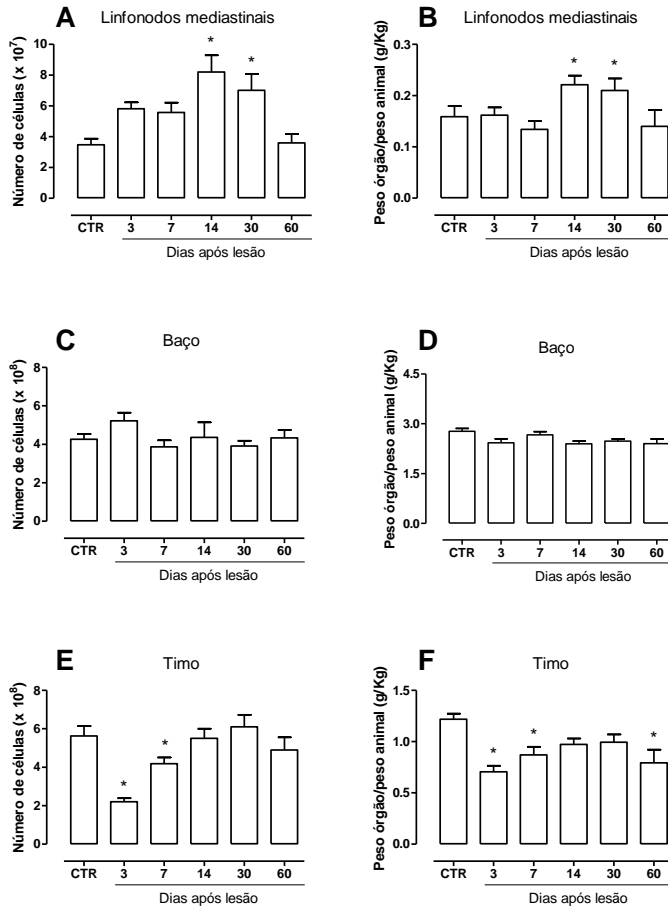


Figura 5: Quantificação do peso úmido e celularidade de órgão linfóides em diferentes tempos após indução da lesão miocárdica. **Coluna esquerda:** Decurso temporal do número de células coletadas a partir dos linfonodos mediastinais (A), Baço (C) e timo (E). **Coluna direita:** Variações na relação do peso de tecido úmido corrigido pelo peso do animal ao longo do processo de reparo do tecido cardíaco pós-lesão. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnet. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR.

4.3 Proliferação de células coletadas dos linfonodos mediastinais

O aumento na celularidade observado nos linfonodos mediastinais (14 dias após lesão miocárdica) foi posteriormente abordado em experimentos em *in vitro* utilizando-se as células obtidas a partir destes órgãos. Estas células foram, então, cultivadas na presença de diferentes concentrações de um extrato cardíaco e sua capacidade proliferativa após 5 dias de cultura foi avaliada. Células coletadas a partir dos linfonodos de animais controle (as quais, em tese, jamais contataram proteínas intracelulares cardíacas em um contexto de ativação linfocitária) não apresentaram proliferação celular quando cultivadas com os extratos cardíacos. No entanto, quando as células obtidas a partir de linfonodos de animais infartados foram cultivadas na presença de tais componentes cardíacos, uma significativa proliferação celular foi observada (Figura 6A). Essa resposta proliferativa foi dependente da dose de extrato cardíaco adicionado em cultura numa faixa de 0,03 – 3 µg/ml de proteínas cardíacas, e já pôde ser induzida mesmo nas doses mais baixas utilizadas (índice de proliferação grupo controle cultivado com 3 µg/ml de proteínas cardíacas = $1,0 \pm 0,07$; grupo lesão $2,3 \pm 0,4$; $P < 0,05$).

Para melhor caracterizar essa atividade imunológica voltada para os próprios tecidos cardíacos, conduziu-se então um grupo de experimentos com animais tratados para tornarem-se tolerantes a epítomos cardíacos previamente à indução do infarto, por meio do contato oral destes antígenos (grupo TOL+ISO). Neste caso, quando as células coletadas a partir de linfonodos mediastinais de animais do grupo TOL+ISO foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de extrato cardíaco nenhuma resposta proliferativa foi observada (índice de proliferação grupo TOL+ISO cultivado com 3 µg/ml de proteínas cardíacas = $0,85 \pm 0,14$; $P < 0,05$ quando comparado ao grupo ISO).

Cabe ainda ressaltar que as células de todos os grupos experimentais proliferaram quando cultivadas na presença de um mitógeno inespecífico, como a concanavalina A (5 µg/ml). Por outro lado, quando essas células foram cultivadas na presença de ovalbumina (10 µg/ml), um antígeno T-dependente para o qual estes animais não foram previamente sensibilizados, nenhuma resposta proliferativa foi observada (Figura 6B).

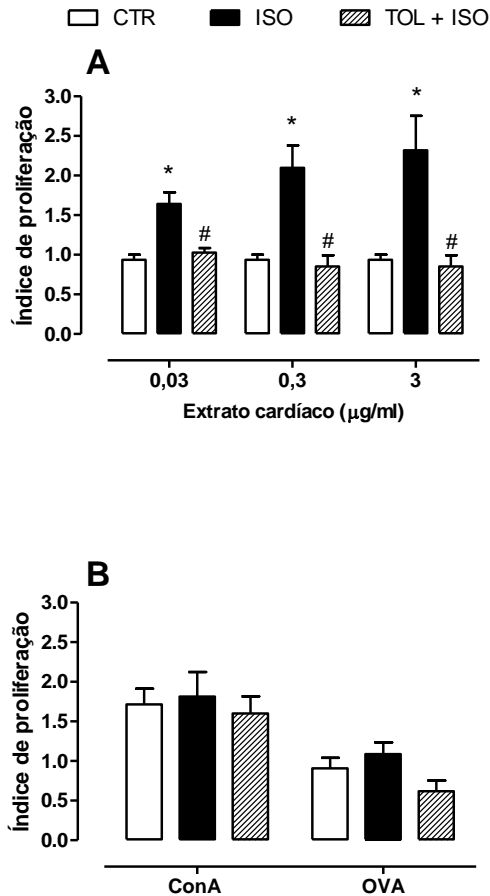


Figura 6: Resposta proliferativa de células obtidas a partir dos linfonodos mediastinais de animais 14 dias após indução de lesão cardíaca. As células foram estimuladas *in vitro* com extratos de proteínas cardíacas (**A**); com Concanavalina A ou ovalbumina (**B**). A resposta proliferativa determinada através da incorporação de [3 H]-Timidina. O grupo TOL+ISO indica os resultados encontrados utilizando-se células coletadas de animais que receberam tratamento oral com o extrato de proteínas cardíacas 7 dias antes da indução do infarto. Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, e # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

4.4 Efeitos da tolerância imunológica aos componentes cardíacos sobre a reconstituição tecidual pós-infarto

Os dados até aqui apresentados sugeriram que a indução de uma lesão tipo-infarto miocárdico com isoproterenol deflagrou eventos auto-imunes. Adicionalmente, viu-se que a proliferação de células autorreativas ativadas contra epítomos cardíacos podia ser reduzida através de um reforço da tolerância natural ao tecido cardíaco realizado previamente à indução da lesão. Assim, na sequência deste trabalho procurou-se na abordar com mais profundidade como o fenômeno de indução de tolerância ao próprio coração influencia o curso que segue a recomposição de um miocárdio lesionado. Então, baseado em nosso conhecimento acerca do modelo experimental utilizado (dados previamente mostrados na Figura 4), utilizou-se a tensão desenvolvida pelo coração montado *ex vivo* como parâmetro indicador da severidade do infarto, bem como da eficácia dos diferentes tratamentos.

A administração de altas doses de isoproterenol promoveu uma significativa redução na capacidade contrátil cardíaca após três dias, quando comparado ao desempenho de corações coletados de animais controle (Figura 7). Nesse contexto, viu-se que o tratamento oral com extratos de ventrículo cardíaco sete dias antes da indução do infarto promoveu uma melhora significativa no desempenho cardíaco. Ademais, tal efeito mostrou-se ser dependente da dose de proteínas cardíacas ingeridas, sendo que a concentração de 20 mg/ml de proteínas cardíacas totais no extrato foi a mais eficiente (Figura 7A; tensão desenvolvida grupo controle $4,0 \pm 0,2$ g; grupo lesão 3 dias $1,93 \pm 0,2$ g; grupo tolerância 20mg + lesão 3 dias $= 3,3 \pm 0,17$ g; $P < 0,05$ entre grupos controle e lesão ; $P < 0,05$ entre grupos tolerância + lesão e somente lesão).

Além de um estudo acerca da dose efetiva deste tratamento para indução de tolerância, também foi feito um estudo acerca da sua especificidade. Assim, apenas o tratamento com extratos de tecido cardíaco da mesma espécie (20 mg de proteínas totais, p.o.) foi eficiente em minimizar o prejuízo motor causado pelo infarto (Figura 7B). Extratos de 20 mg/ml de fígado ou coração de outra espécie (*Mus musculus*) não desencadearam respostas semelhantes à ingestão da mesma dose de extrato de coração de rato (*Rattus norvegicus*). Curiosamente, a ingestão da mesma dose de músculo estriado esquelético pareceu mimetizar parcialmente os efeitos encontrados com a indução de tolerância induzida por músculo estriado cardíaco (Figura 7B).

Ainda no que diz respeito à eficácia das diferentes formas de se reforçar da tolerância natural aos componentes cardíacos, verificou-se que apenas o tratamento oral realizado previamente ao infarto foi efetivo. Tratamentos orais com extratos cardíacos realizados 1 ou 24 horas após a indução das lesões não exerceram nenhum efeito sobre a funcionalidade cardíaca (Figura 7C).

Depois de observados os resultados apresentados na Figura 7, elegeu-se o tratamento oral com extrato de ventrículos cardíacos de rato, contendo 20 mg/ml de proteínas totais, administrados 7 dias antes da indução do infarto. Todos os demais dados funcionais e morfológicos apresentados na sequência deste estudo referem-se a este protocolo de tratamento.

Uma vez definido o melhor protocolo de tratamento oral, as consequências da tolerância imunológica aos tecidos cardíacos sobre a função do coração foi avaliada *ex vivo* 3 dias após o infarto. Para tal, corações coletados de animais controle (CTR), lesionados (ISO) ou submetidos ao protocolo de tolerância oral antes da indução do infarto (TOL + ISO) foram montados em um sistema de órgão isolado e perfundido. Por um lado, a tensão desenvolvida durante a contração, bem como suas derivadas temporais foram aferidas acoplando-se o coração a um transdutor de força. Estes dados encontram-se nos painéis A e B da Figura 8. Por outro lado, em um conjunto diferente de experimentos, os corações foram acoplados a um transdutor de pressão, através de um balão posicionado no interior do ventrículo esquerdo. Neste caso, medidas de pressão intraventricular desenvolvida, suas derivadas temporais, pressão final diastólica e tempo de duração dos ciclos foram aferidos e encontram-se nos painéis C-F da Figura 8.

A lesão tipo infarto induzida por isoproterenol promoveu importantes prejuízos motores ao coração. Após 3 dias de lesão, corações coletados de animais infartados desenvolveram uma tensão e pressão desenvolvida significativamente reduzidas ($P < 0,05$), quando comparados ao desempenho de animais controle (Figura 8A e 8C). Da mesma forma, as velocidades de contração e relaxamento foram substancialmente diminuídas após o infarto, como pode ser observado nas Figura 8B e 8D ($P < 0,05$). Embora tenha havido uma tendência, dados preliminares indicaram não haver alterações significativas na pressão intraventricular pós-infarto (Figura 8C). Da mesma forma, a duração do ciclo cardíaco, seja em sístole ou em diástole não foram alteradas pelas lesões induzidas com isoproterenol (Figura 8E). O tratamento com 20 mg de proteínas cardíacas feito 7 dias antes da

indução do infarto reverteu os efeitos deletérios causados pelo infarto nos que diz respeito aos parâmetros tensão desenvolvida, $+dT/dt$ e $+dP/dt$, mas não o parâmetro $-dT/dt$. Por fim, nota-se que 3 dias após o infarto miocárdico, corações retirados de animais injetados com isoproterenol mostraram uma significativa redução no aumento no trabalho cardíaco decorrente da ativação com dobutamina (Figura 8F). Essa redução na resposta adrenérgica não foi verificada em animais infartados que haviam sido tornados tolerantes aos componentes cardíacos (aumento na pressão desenvolvida em resposta à dobutamina).

Também avaliou-se as repercussões funcionais a longo prazo do tratamento considerado aqui neste estudo (Figura 9). Além do prejuízo motor que ocorreu três dias após o infarto miocárdico, o qual foi mais mostrado nas Figuras 7 e 8, cabe ressaltar que este modelo de lesão inclui ainda um segundo período de disfunção cardíaca, presente 60 dias após a lesão.

As alterações funcionais encontradas nos momentos mais tardios em animais infartados são diferentes das alterações caracterizadas para os momentos agudos. Enquanto que no terceiro dia após infarto observava-se um prejuízo em diversos parâmetros, como $+dT/dt$ e $-dT/dt$, apenas a tensão desenvolvida permanecia alterada em 60 dias (Figura 9).

A análise cinética da funcionalidade cardíaca revela ainda dois aspectos importantes sobre o grupo TOL+ISO. Por um lado, é surpreendente que uma única administração oral do extrato em estudo apresente consequências que podem ser observadas mesmo 60 dias após a indução do infarto miocárdico, (Figura 9A). Por outro lado verificou-se também que esse mesmo protocolo de tratamento não foi capaz de reverter a redução do tempo de relaxamento induzido pelo infarto em 3 e 14 dias (Figura 9C).

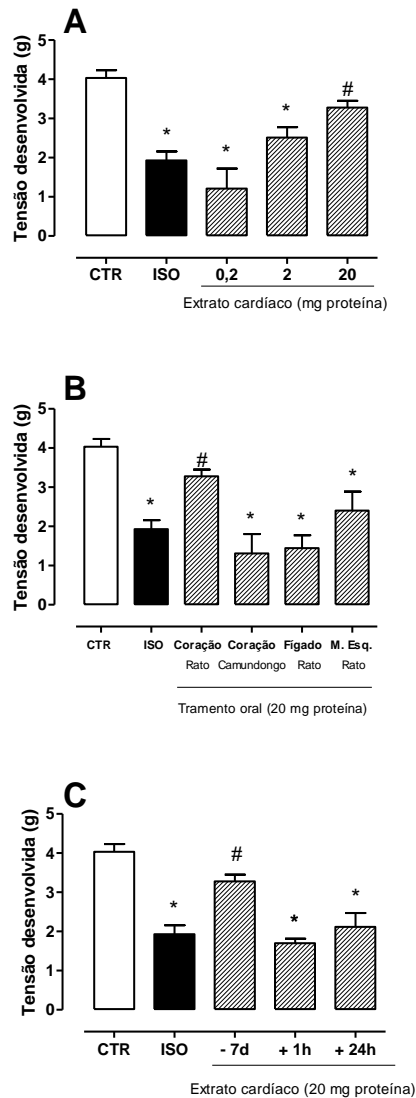


Figura 7: Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de indução de tolerância sobre o desempenho cardíaco avaliado 3 dias após a indução da lesão cardíaca. **Painel A:** Dependência da dose de extrato cardíaco administrado p.o. 7 dias antes da indução do infarto. **Painel B:** avaliação da especificidade dos efeitos. Extratos contendo 20 mg de proteínas de corações de rato (*Rattus*

norvegicus), corações de camundongos (*Mus musculus*), fígado ou músculo esquelético de rato foram administrados 7 dias antes do infarto. **Painel C:** Avaliação da eficácia dos tratamentos realizados em diferentes momentos. Animais receberam uma única administração de extrato cardíaco (20 mg) 7 dias antes, 1 ou 24 horas após a indução do infarto. Barras abertas indicam grupo controle, barras fechadas indicam grupo lesão e barras hachuradas indicam animais que receberam diferentes tratamentos orais. Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, e # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

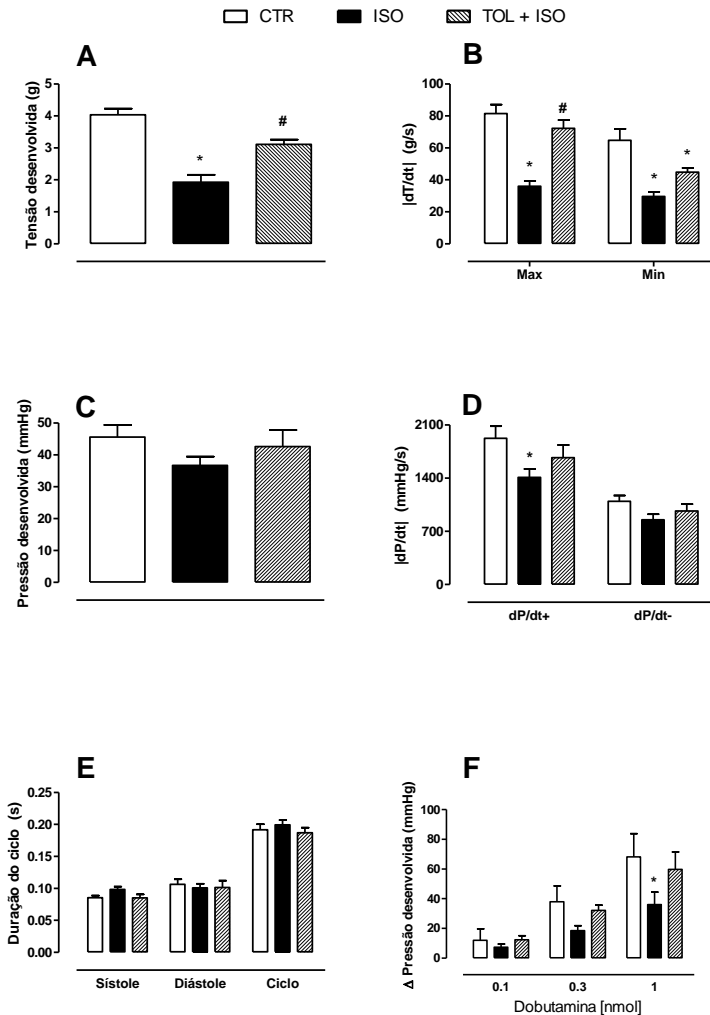


Figura 8: Desempenho cardíaco avaliado através da preparação de Langendorff realizado 3 dias após a indução das lesões. **Painel A:** Tensão desenvolvida (g); **Painel B:** Módulo das derivadas temporais positivas (+dT/dt) e negativas (-dT/dt) da tensão desenvolvida (g/s). **Painel C:** Pressão intraventricular desenvolvida (mm Hg); **Painel D:** Velocidade de contração e relaxamento. **Painel E:** Duração da sístole, diástole e do ciclo contrátil completo (s). **Painel**

F: Variação na pressão desenvolvida em resposta à dobutamina. Barras abertas indicam grupo controle, barras fechadas indicam grupo lesão e barras hachuradas indicam animais que receberam tratamento oral com 20 mg de extrato cardíaco 7 dias antes da administração de isoproterenol (TOL+ISO). Para os painéis A, C e E: análise estatística ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. Para os painéis B, D e F: análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.* representa $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR, e # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

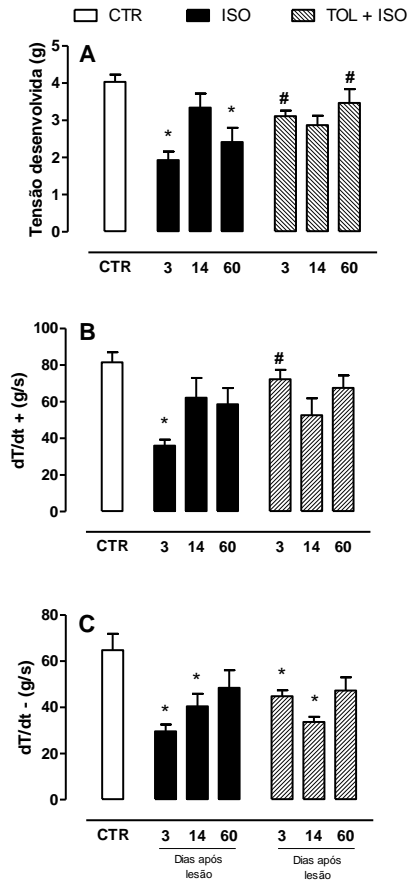


Figura 9: Decurso temporal dos efeitos da tolerância aos componentes cardíacos sobre o desempenho de corações montados *ex vivo* em sistema de Langendorff. **Painel A:** Tensão desenvolvida (g); **Painel B:** Derivada temporal positiva (+dT/dt). **Painel C:** Derivada temporal negativa (-dT/dt). Barras abertas indicam grupo controle ; barras fechadas indicam o grupo lesionado e as barras hachuradas indicam animais que receberam tratamento oral com 20 mg de extrato cardíaco 7 dias antes da administração de isoproterenol (TOL+ISO). Análise estatística ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnet. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR e # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

4.5 Abordagem morfológica

Com base nos dados previamente apresentados acerca do perfil cinético de migração leucocitária para o sítio das lesões (Figura 4), o intervalo de 3 dias foi escolhido como representativo para se avaliar os efeitos do tratamento sobre a inflamação local pós-infarto. Após conduzir uma análise semi-quantitativa, atribuindo scores histopatológicos aos graus de infiltrado celular, encontrou-se que a administração de isoproterenol promoveu intenso influxo leucocitário ao miocárdio. Este infiltrado era composto majoritariamente por células mononucleares e se distribuía preferencialmente na região subendocárdica do ventrículo esquerdo. Encontrou-se que o tratamento oral com extratos cardíacos reduziu significativamente a presença de leucócitos mononucleares no miocárdio de animais lesionados (Figura 10A; score de infiltrado na região subendocárdica do grupo controle $0,30 \pm 0,09$; lesão $1,8 \pm 0,2$; tolerância + lesão $0,91 \pm 0,15$; $P < 0,05$ entre grupos controle e lesão ; $P < 0,05$ entre grupos lesão e tolerância + lesão). Uma micrografia representativa dos graus de scores adotados nesta análise encontram-se na Figura 10 B-E.

Em momentos mais tardios, porém, esse processo inflamatório deu lugar à eventos fibroproliferativos, de modo que nos períodos de 14 e 60 dias a deposição de colágeno foi quantificada (Figura 11). A análise histológica demonstrou que animais do grupo ISO 60 dias apresentavam cerca de $20 \pm 4,8$ % da área ventricular marcada positivamente para a coloração com Picrosirius, contra apenas $1,4 \pm 0,3$ % de animais controle ($P < 0,05$). Esta deposição de colágeno encontrava-se significativamente reduzida em corações coletados de animais do grupo tolerância + lesão ($5,3 \pm 1,7$; $P < 0,05$).

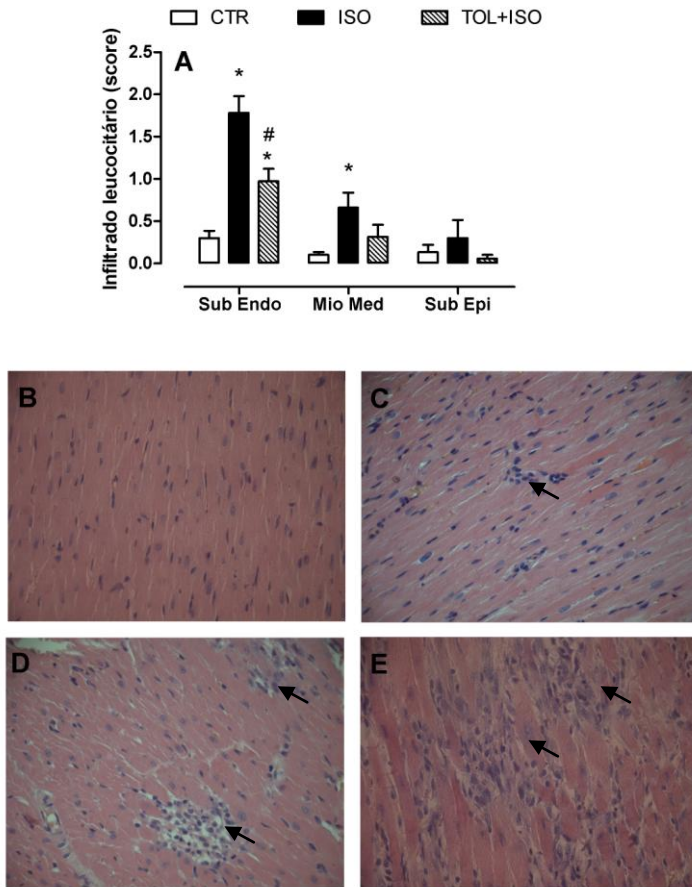


Figura 10: Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado leucocitário em corações coletados 3 dias após a injeção de isoproterenol, observados em secção transversal medial, e corados com hematoxilina e eosina. **Painel A:** Avaliação realizada em três diferentes regiões anatômicas: subendocárdica (sub endo), miocárdio medial (mio med) e subepicárdio (sub epi) nos diferentes grupos experimentais. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnet. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle ; # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo lesão . Uma micrografia representativa (magnitude 400x) de cada um dos graus de score histopatológico encontra-se apresentada nos demais painéis. **Painel B:** nenhum infiltrado observado (0). **Painel C:** pouco (+). **Painel D:** moderado (++). **Painel E:** intenso (+++). As setas indicam a presença de infiltrado leucocitário.

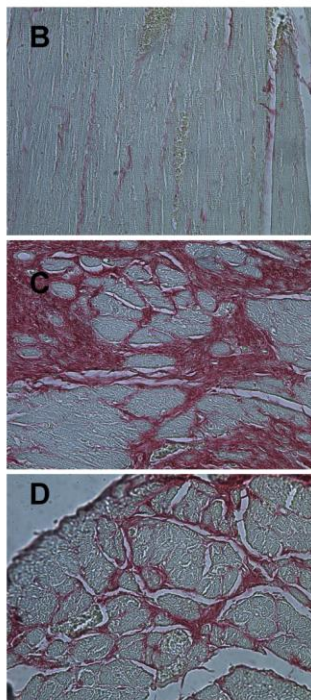
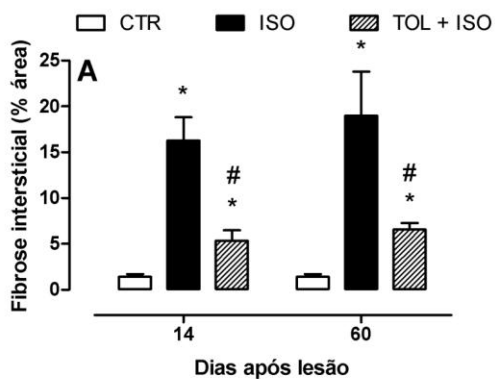


Figura 11: Avaliação da fração de área de colágeno em corações seccionados transversalmente e corados com picrosirius. **Painel A:** Corações de animais controle (CTR), lesionados (ISO), ou submetidos ao protocolo de tolerância a epitopos cardíacos previamente ao infarto (TOL+ISO) foram coletados 14 ou

60 dias após a indução do infarto, e um total de 10 campos por secção foram analisados com auxílio do programa Image J. Os dados encontram-se expressos em % de área marcada positivamente com a coloração. Análise estatística ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnet. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle; # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo lesão. As micrografias (magnitude 400x) representam campos tipicamente encontrados em corações de animais controle (**Painel B**), injetados com isoproterenol (**Painel C**), ou tornados tolerantes previamente ao infarto (**Painel D**).

4.6 Efeitos da imunização contra epítomos cardíacos sobre o reparo e função cardíaca após injeção de isoproterenol

Por fim, em uma nova série de experimentos procurou-se reforçar (ao invés de inibir) as respostas autoimunes pós-infarto. Deste modo, animais foram sensibilizados contra os extratos de ventrículo cardíaco em adjuvantes (i.p.) e foram posteriormente infartados. Posteriormente seu processo de reparo foi avaliado. Os dados apresentados na Figura 12 mostram alguns aspectos avaliados nesse grupo (IM+ISO).

Resumidamente, observou-se que a imunização não se mostrou simplesmente como um tratamento oposto à tolerização. A sensibilização prévia aos componentes cardíacos, não modificou o curso de alterações funcionais cardíacas observadas após o infarto miocárdico em nenhum dos períodos avaliados (Figura 12A), não modificou a extensão do infiltrado leucocitário (Figura 12B), e nem tampouco aumentou a área de fibrose no ventrículo esquerdo (VE), o sítio primário das lesões cardíacas (Figura 12C).

Em contrapartida, animais do grupo IM+ISO apresentaram importantes alterações no ventrículo direito (VD) (Figura 12C). Se, por um lado, a imunização prévia não aumentou a área de fibrose no sítio inicial da lesão (VE), esse procedimento resultou no surgimento de um processo fibrótico no VD. Neste local a fibrose não foi encontrada nos outros grupos (fração de área de colágeno no VD em 60 dias IM+ISO = $37 \pm 11,2\%$; ISO 60 dias = $10,1 \pm 1,3\%$; controle $2,1 \pm 0,24\%$). Animais somente lesionados (não imunizados) não apresentaram alterações marcantes na região do VD, embora apresentassem alterações marcantes no VE. No entanto, animais que haviam sido imunizados com extratos cardíacos em adjuvante previamente ao infarto apresentaram proeminente fibrose e paredes do VD com significativo adelgaçamento, como demonstrado nas micrografias das Figuras 12D a 12E.

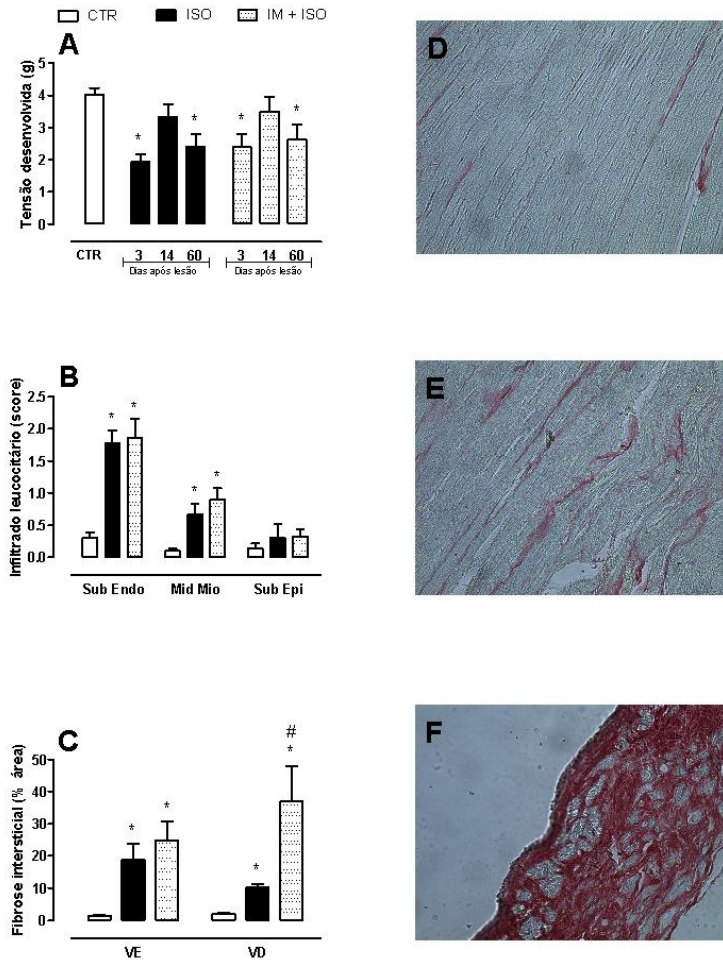


Figura 12: Consequências morfofuncionais da imunização contra componentes cardíacos realizada 14 dias antes da indução do infarto miocárdico. **Painel A:** Desempenho ventricular avaliado *ex vivo* em diferentes momentos após as injeções de isoproterenol. **Painel B:** avaliação do infiltrado leucocitário no miocárdio observado 3 dias após a indução das lesões cardíacas em corações seccionados transversalmente e corados com hematoxilina e eosina. **Painel C:** Quantificação da deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (VE) e direito (VD) em corações coletados 60 dias após a indução do infarto, seccionados transversalmente e corados com Picrosirius. Análise estatística ANOVA de

uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnet. * representa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle ; # representa $P < 0,05$ em relação ao grupo lesão. As micrografias representam campos tipicamente encontrados nos ventrículos direito de animais controle (CTR, **Painel D**), lesionados (ISO, **Painel E**) ou imunizados contra antígenos cardíacos previamente à lesão por isoproterenol (IM + ISO, **Painel F**). Todas as micrografias apresentadas encontram-se com a mesma magnitude (400x).

5.1 Considerações sobre o modelo experimental

Agonistas β -adrenérgicos, como o isoproterenol possuem ações cronotrópicas e inotrópicas positivas, promovendo um aumento significativo no débito cardíaco. Esse aumento no trabalho cardíaco promove uma maior demanda de consumo de oxigênio, além de ser responsável por causar depleção nas reservas energéticas dos cardiomiócitos. Concomitante aos seus efeitos cardíacos, o isoproterenol promove relaxamento vascular e significativa hipotensão, inclusiva na circulação coronariana. Esse desacoplamento entre oferta e demanda por oxigênio e nutrientes no músculo cardíaco resulta numa isquemia miocárdica sustentada, e, por conseguinte, é responsável por promover uma lesão com características anatômicas semelhantes ao infarto agudo miocárdico (RONA ET AL., 1959). Apesar de este ser o mecanismo mais importante na patogênese cardíaca induzida por isoproterenol, outros aspectos ainda podem ser apontados. Milei e Rapaport (1976) demonstraram que catecolaminas podem exercer efeitos cardiotóxicos por promover alterações na permeabilidade das membranas de cardiomiócitos. Muitos outros trabalhos têm demonstrado que catecolaminas podem ainda interferir com o controle iônico de Ca^{++} e K^{+} no músculo cardíaco (SINGAL, ET AL., 1981), e aumentar significativamente a produção de radicais livres e promover maior estresse oxidativo (MOHAN e BLOON, 1999). Porém, a despeito desses efeitos cardiotóxicos comuns a todas as catecolaminas, o consenso na literatura é de que o principal mecanismo pelo qual isoproterenol produz as lesões miocárdicas é mesmo através de um desequilíbrio na demanda/oferta de oxigênio (CHAPPEL ET AL., 1963).

As características histológicas dessas lesões induzidas por isoproterenol foram exaustivamente caracterizadas por Rona et al. (1959) e posteriormente por Chappel, et al. (1963). As alterações nos diversos tecidos de ratos injetados com altas doses de isoproterenol é um fenômeno criticamente dependente da concentração administrada da droga. Segundo estes autores, quando administrado em concentrações até 322 $\mu\text{mol/kg}$, o isoproterenol produz alterações necróticas exclusivamente no tecido cardíaco, ainda que edema pulmonar possa ser eventualmente produzido com esse tratamento. Em contrapartida, quando administrado em concentrações que variavam entre 322 – 685 $\mu\text{mol/kg}$, lesões necróticas nos rins, fígado, e vísceras abdominais podem ocorrer. No presente estudo o único órgão avaliado histologicamente foi o coração. Porém, considerando-se que a concentração de isoproterenol administrada nos experimentos deste

trabalho foi de 140 $\mu\text{mol/kg}$, é pouco provável assumir que lesões necróticas extra-cardíacas tenham ocorrido.

Segundo dados da literatura (CAMPOS, ET AL., 2008; RONA ET AL., 1959), bem como dados encontrados no presente trabalho, a necrose miocárdica frequentemente localiza-se no ápice cardíaco e músculos papilares, abrangendo predominantemente as regiões subendocárdicas do ventrículo esquerdo. Histologicamente, essas lesões necróticas mostravam-se focais, e caracterizadas por edema intracelular e intercelular.

Uma resposta inflamatória, predominantemente composta por leucócitos mononucleares, distribuía-se de acordo com as lesões necróticas pelo coração, concomitante a uma severa disfunção cardíaca. A correlação morfo-funcional 3 dias após lesão foi bastante clara em apontar que o maior prejuízo motor encontrado nos experimentos coincidiu com os momentos de atividade inflamatória aguda. À medida que a resposta inflamatória no interstício cardíaco se resolvia, um processo fibrótico iniciava-se com deposição de colágeno. Nesses períodos em que a inflamação diminuiu e em que a área lesionada foi substituída por deposição de matriz extracelular, observou-se uma importante capacidade do coração compensar seu prejuízo motor (14 dias). Porém, à medida que essa deposição de colágeno prosseguiu desenvolvendo-se indeterminadamente, encontrou-se que após 60 dias da lesão os corações de animais infartados tornaram a apresentar prejuízo no seu desempenho contrátil.

Uma vez estabelecidas essas características cinéticas de lesão e reparo cardíaco, decorrente da administração de isoproterenol, bem como as correlações morfo-funcionais desta situação experimental, prosseguiu-se com a investigação sobre como atividade imune-inflamatória tomava parte nos fenômenos pós-infarto miocárdico.

5.2 Considerações sobre a atividade imune-inflamatória pós-infarto miocárdico

A descoberta de populações de células progenitoras capazes de diferenciar-se em todos os fenótipos cardíacos, ocorrendo naturalmente no coração de roedores e humanos adultos (MESSINA, ET AL., 2004) levantou imediatamente a questão sobre porque o coração necessariamente segue um reparo cicatricial após um infarto miocárdico. O fato de que corações de mamíferos adultos podem ter os elementos necessários para sua reconstrução, sem, no entanto, fazê-lo

demanda uma explicação sobre porque adultos não regeneram seus corações.

Nesse contexto, um editorial recente na revista *Circulation Research* (GARRY e MARTIN, 2004) procurou discutir as limitações para uma apropriada regeneração cardíaca e apontou três possíveis fatores envolvidos (apresentados na Figura 13): 1) mesmo tendo sido caracterizada, esta população de células progenitoras cardíacas endógenas pode existir em quantidade insuficiente para o repovoamento adequado após uma lesão miocárdica de ampla área de cobertura; 2) as respostas fibroproliferativas podem limitar o acesso destas células indiferenciadas à área danificada, servindo como uma barreira anatômica; e 3) o *microambiente* demasiadamente inflamatório no miocárdio lesionado pode exercer ações negativas sobre a diferenciação e o desenvolvimento adequado de novas fibras cardíacas. Este último aspecto – uma intervenção negativa de alguns aspectos da atividade imuno-inflamatória sobre a regeneração – nos parece ser um fator prevalente que merece maior detalhamento no contexto da lesão cardíaca.

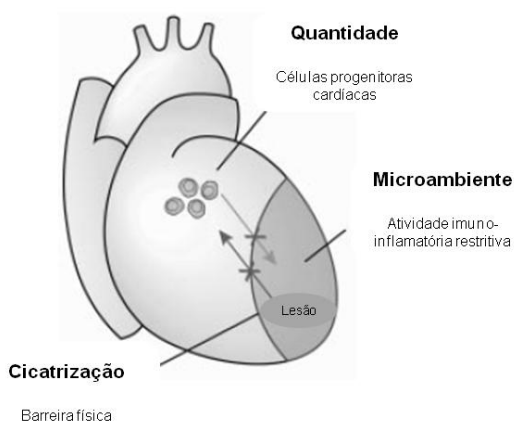


Figura 13: Obstáculos para a regeneração cardíaca segundo Garry e Martin (2004). Segundo os autores, um número limitado de células progenitoras, a formação de cicatriz ou um microambiente inflamatório desfavorável poderiam ser fatores limitantes ao adequado reparo cardíaco. No presente trabalho, a participação da atividade imuno-inflamatória nessa problemática foi abordado com especial interesse.

5.2.1 Autoimunidade patogênica

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram a transformação blástica de linfócitos após contato com antígenos solúveis do coração em animais infartados com isoproterenol. Essa proliferação de linfócitos contra extratos cardíacos não foi observada em animais controles (CTR), nem em animais que foram expostos oralmente (TOL+ISO) aos antígenos cardíacos previamente ao infarto. As respostas proliferativas à ConA demonstram que os linfócitos coletados de animais dos grupos CTR e TOL+ISO, eram perfeitamente capazes de proliferar. O cultivo de linfócitos na presença de ovalbumina teve como objetivo validar a especificidade da atividade imune pós-infarto miocárdico, bem como do tratamento oral com antígenos cardíacos. Assim, sendo um antígeno T-dependente para o qual os animais não haviam sido sensibilizados ou tolerizados, a ovalbumina não foi capaz de deflagrar uma resposta proliferativa em linfócitos obtidos a partir de quaisquer grupos experimentais.

Em consonância aos dados encontrados no presente trabalho, Varda-Bloom, et al. (2005) encontraram que linfócitos obtidos a partir do baço de ratos submetidos ao infarto miocárdico era capazes de proliferar quando incubados com cardiomiócitos de ratos neonatos. Além disso, esses autores demonstraram que além de proliferação celular, esses linfócitos coletados de animais infartados eram capazes de induzir necrose de cardiomiócitos de neonatos adicionados à cultura celular.

A possível associação entre uma atividade patogênica autoimune aos componentes cardíacos e a inflamação pós-infarto miocárdico foi inicialmente proposta por Maisel, et al. (1999). Estes autores demonstraram que a transferência adotiva de linfócitos obtidos a partir do baço de camundongos infartados através da obstrução das coronárias para animais saudáveis singênicos promoveu miocardite autoimune mediada por células T.

Após a necrose de cardiomiócitos, componentes exclusivamente intracelulares são liberados para o meio extracelular e para a circulação sistêmica. A exposição de proteínas citoplasmáticas cardíacas num contexto inflamatório encontrado no miocárdio lesado pode excitar a produção de anticorpos contra epitopos cardíacos, bem como a ativação de linfócitos TCD8, citotóxicos, sensibilizados aos antígenos cardíacos (VARDA-BLOOM, 2000). Nesse contexto, alguns componentes dos cardiomiócitos já se mostraram particularmente

capazes de se tornar especialmente imunogênicos na ocasião de um infarto miocárdico.

Morau, et al. (2005), ao estudar linfócitos obtidos a partir de amostras de sangue de humanos com história recente de infarto miocárdico, encontraram que cerca de 1/3 dos pacientes analisados apresentaram linfócitos capazes de proliferar frente ao estímulo com miosina cardíaca.

Estudos prévios de grupos independentes já relataram que a miosina cardíaca é um componente capaz de induzir miocardite autoimune em camundongos (ROSE ET AL., 1984; WANG, ET AL., 1999; 2003). De Scheerder et al. (1985; 1989) encontraram anticorpos contra as proteínas da maquinaria contrátil cardíaca (actina e miosina) em pacientes com história recente de infarto miocárdico. Além disso, Zhang, et al. (2005) observaram que linfócitos T-específicos reativos à miosina cardíaca podem promover inflamação no miocárdio e remodelamento cardíaco.

Todos esses experimentos sugerem que a miosina cardíaca possa ser um componente antigênico importante no contexto particular pós-infarto miocárdico. No entanto, a simples ocorrência de proliferação de linfócitos ativados contra extratos cardíacos observada nesse estudo não indica necessariamente que este aspecto autoimune seja deletério ao reparo cardíaco. No entanto, a prévia exposição oral ao extrato cardíaco aboliu a proliferação de linfócitos na exposição *in vitro* ao mesmo extrato, um resultado compatível com o que se conhece em imunologia como tolerância oral.

5.2.2 Imunidade e função cardíaca

Como foi um modelo experimental inicialmente proposto por patologistas, as alterações histológicas produzidas pelo isoproterenol estão mais bem caracterizadas que as alterações funcionais cardíacas. Dentre os poucos estudos que abordam a funcionalidade cardíaca neste modelo, Beznak et al. (1962) encontraram que, apesar da extensa lesão necrótica no miocárdio, ratos infartados com isoproterenol não apresentavam menor débito cardíaco em estado de repouso. Esses autores propuseram que ratos apresentam uma reserva cardíaca suficientemente grande para compensar prejuízo no débito decorrente das lesões. Assim, eles encontraram que a melhor maneira de avaliar a função cardíaca nesse caso seria avaliando as respostas cardíacas sob estresse. Assim, estes autores promoveram um aumento na pré-carga, por meio de um incremento na viscosidade sanguínea, e encontraram

que animais previamente injetados com altas doses de isoproterenol não apresentavam um significativo aumento no débito cardíaco, quando comparado aos animais naïve. Campos, et al. (2008), avaliando o mesmo modelo, também não encontraram alterações funcionais marcantes em animais no estado de repouso, apesar de apresentarem lesões histológicas.

No presente trabalho, encontrou-se que em 1, 3 e 60 dias pós-infarto, a capacidade contrátil cardíaca estava prejudicada quando avaliada em preparação de órgão isolado e perfundido. A administração de isoproterenol promoveu decréscimo no desenvolvimento da tensão, velocidade de contração e de relaxamento. Acredita-se que essas alterações funcionais tenham sido observadas no presente estudo, mas não em outros estudos anteriores na literatura, pelo fato de que o desempenho cardíaco foi avaliado em uma preparação de órgão isolado, pois nessas condições, o tônus simpático, bem como o tônus renal são perdidos. Assim, a capacidade contrátil do miocárdio pode ser aferida com menos interferências, tornando mais visível as consequências motoras da necrose e inflamação do miocárdio.

O achado mais relevante no que diz respeito à função cardíaca pós-infarto foi o de que o reforço da “tolerância imunológica natural” ao próprio coração previamente ao infarto, impediu o desenvolvimento do prejuízo motor cardíaco. Essa proteção funcional cardíaca promovida pelo tratamento oral com extratos cardíacos foi dependente da dose de proteínas cardíacas ingeridas, foi produzida especificamente com extratos de coração da mesma espécie, e apenas quando ingeridos previamente à lesão. É interessante perceber que o músculo cardíaco de uma espécie evolutivamente relacionada - o camundongo, *Mus musculus* - não foi capaz de reproduzir os efeitos protetores da tolerância. Além disso, mesmo um tecido relacionado ao tecido cardíaco, o músculo esquelético de rato, tampouco foi capaz de reproduzir os efeitos da tolerização com extratos cardíacos. Nesse contexto, cabe citar os dados de Kushner e Kaplan (1967), que estudaram as características antigênicas do coração. Ao estudar o perfil de anticorpos secretados por animais imunizados contra tecidos cardíacos, encontraram a presença de alguns antígenos cardíacos específicos, que não eram compartilhados por nenhum outro tecido, como fígado e rins, e nem mesmo com o tecido muscular esquelético. O fato de que os extratos cardíacos só apresentam efeitos sobre a função cardíaca pós-infarto quando administrados 7 dias antes da indução das

lesões indica fortemente que esse processo de tolerância demanda um tempo considerável, que pode ser decorrente de uma dependência de processos como divisão celular e re-distribuição e migração de células. Já foi extensivamente demonstrado na literatura que, enquanto a tolerância oral é facilmente induzida em animais naïve, ela é muito dificilmente induzida em animais previamente sensibilizados (imunizados) para um determinado antígeno (YOSHINO, ET AL., 1995; CONDE ET AL., 1998; FARIA e WEINER, 2005).

Dados prévios na literatura já haviam demonstrado que a atividade de linfócitos pode prejudicar diretamente a função cardíaca. Yu, et al (2005) observaram que camundongos infectados com retrovírus LP-BM5, um variante do vírus da leucemia murina, desenvolviam um perfil sistêmico de atividade imunológica que eles chamaram tipo Th₂. Nessa situação, camundongos aumentaram níveis sistêmicos de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17, e, inesperadamente, essa atividade linfocitária resultava no desenvolvimento de falência cardíaca. Ainda neste mesmo trabalho, quando esses autores estimulavam o sistema imunológico por diferentes mecanismos, de modo a deflagrar a expressão sistêmica de citocinas como TGF- β , IFN- γ , IL-2, IL-15 e IL-18 (um perfil que eles chamaram de tipo Th₁) foi observado que a atividade imunológica promovia maior deposição de colágeno no miocárdio, resultando também em significativas alterações funcionais.

Adicionalmente, Fixler et al. (1994) encontraram que linfócitos T citotóxicos sensibilizados contra componentes cardíacos promoviam importantes alterações na fisiologia de cardiomiócitos. Tanto o contato direto de linfócitos reativos aos cardiomiócitos co-cultivados, quanto a adição de sobrenadante das culturas linfocitárias no meio em que os cardiomiócitos eram cultivados foram capazes de reduzir a contratilidade espontânea, bem como o potencial de ação de cardiomiócitos.

No presente trabalho ensaios de proliferação *in vitro* das células obtidas a partir linfonodos mediastinais indicaram presença de linfócitos reativos ao tecido cardíaco. Levando-se em consideração esses resultados descritos por Fixler, et al. (1994), sugere-se que o prejuízo motor pós-infarto encontrado em nosso trabalho possa ser, ao menos em parte, promovido pela atividade de linfócitos T sobre cardiomiócitos. Essa idéia reforça-se quando analisados os dados que mostraram que a inibição dos linfócitos auto-reativos ao coração, por meio da tolerância oral à esses antígenos, reverteu o prejuízo funcional pós-cardíaco

observado. Além disso, chama-se atenção de que o prejuízo motor mais proeminente coincidia com os picos da migração de leucócitos inflamatórios para o local da lesão.

Acredita-se que em momentos mais agudos após o infarto (3 dias), a participação imunológica no prejuízo motor se dê pelo comprometimento de um número ainda maior de cardiomiócitos, aumentando as bordas da lesão isquêmica inicial. Os achados que mostram que animais tornados tolerantes ao tecido cardíaco previamente ao infarto apresentaram uma região com infiltrado leucocitário menor após essa idéia. Nesse caso, impedir a agressão linfocitária ao coração seria importante por impedir a expansão da lesão para áreas não isquêmicas. Embora animais do grupo IM+ISO tenham seguido, sob muitos aspectos, um curso de reparo de lesão idêntico aos animais simplesmente infartados, o fato de que a imunização contra componentes cardíacos tenha expandido a necrose miocárdica ao VD, uma área inicialmente não lesada pelo tratamento com isoproterenol, é uma evidência importante, simétrica à obtida em animais tolerantes, que também aponta a atividade imunológica nos momentos iniciais como um fator determinante da configuração tecidual da lesão.

Se, por um lado, o tratamento oral com antígenos cardíacos parece ter relevância terapêutica por reduzir a extensão da inflamação local, em momentos mais tardios, esses efeitos benéficos parecem ter outras explicações. Em momentos mais tardios (como aos 60 dias), acredita-se que a disfunção motora do coração seja decorrente de um longo processo de deposição excessiva de matriz extracelular seguido por remodelamento da arquitetura das paredes. Nesse caso, a participação imunológica possivelmente seria sobre a maturação da lesão, *e.g.*, sobre a atividade dos fibroblastos. Assim, nesses períodos crônicos, especula-se que a tolerância oral desempenhe um papel mais relacionado com a diminuição da deposição de colágeno e do processo fibrótico em geral. Essa idéia é coerente com uma menor deposição de colágeno observada em animais tolerizados antes do infarto, quando comparado a animais simplesmente infartados. Além disso, dados de Yu, et al. (2005) mostraram previamente que, dependendo de suas características, a atividade linfocitária num contexto inflamatório pode promover fibrose cardíaca.

5.2.3 Imunidade e reparo tecidual cardíaco

Em situações fisiológicas, há uma trama de colágeno importante na manutenção da forma e da função cardíaca (WEBER, ET

AL., 1989). Devido às características bioquímicas e biofísicas do colágeno, sua presença no tecido cardíaco é um fator que colabora com a rigidez do tecido. Por um lado, o acúmulo de colágeno fibrilar que ocorre como um processo de fibrose reparativa ao substituir cardiomiócitos necróticos, resulta em um aumento na rigidez do tecido. Isso, somado ao fato de que a trama de colágenos serve de suporte para a organização de cardiomiócitos, por fim resulta em um comprometimento da contração e relaxamento cardíaco. Além disso, ao estudar o padrão de deposição de colágeno após a injeção de isoproterenol em ratos, Pick, et al. (1989) fez duas observações importantes. Primeiramente, a lesão induzida por isoproterenol promove uma modificação do tipo de colágeno depositado no esqueleto cardíaco, resultando num maior acúmulo de colágeno tipo III. Além disso, enquanto que em um coração saudável as fibras de colágeno encontram-se em paralelo com a distribuição dos cardiomiócitos, após a lesão essas fibras encontram-se depositadas de maneira difusa, sem acoplamento com a arquitetura das células contráteis. Essas duas características promovem um prejuízo na capacidade contrátil do órgão.

No presente estudo, encontrou-se que a administração de isoproterenol deflagrou um influxo mononuclear agudo, sobretudo nas regiões subendocárdicas do coração. Essa atividade inflamatória, por sua vez, deu lugar a um processo fibroproliferativo, com deposição de colágeno, que seguiu se desenvolvendo durante todo o período experimental. No presente trabalho, não examinamos nem a configuração arquitetônica das fibras colágeno no tecido nem a determinação dos subtipos de colágeno. Apenas a fração de área de colágeno total foi determinada através da coloração de picrossírius. Ainda assim, com base na literatura, pode-se sugerir que o prejuízo motor observado 60 dias após a lesão está relacionado com o aumento na área de fibrose nos animais infartados. Ademais, animais tornados tolerantes aos componentes cardíacos que apresentaram uma menor área de fibrose em 14 e 60 dias após a lesão, também apresentaram preservação da funcionalidade motora em 60 dias. Em nosso trabalho, não estudamos a relação entre linfócitos e fibroblastos. No entanto, alguns dados da literatura apóiam a idéia de que a atividade linfocitária é um fator determinante para processos fibróticos que se passam em decorrência de lesões.

Estudos do grupo de Ferguson (*e.g.* McCALLION E FERGUSON, 1995; WHITBY e FERGUSON, 1991) são contundentes em demonstrar

que lesões cutâneas que ocorrem na ausência de ativação inflamatória importante não produzem cicatrizes, como no caso de lesões em fetos de mamíferos. Da mesma forma, a atividade inflamatória no local da lesão cutânea promove eventos fibrópoliferativos e aumento na deposição de matriz de colágeno, conduzindo à fibrose (FRTANTZ ET AL., 1993).

No que diz respeito à participação de linfócitos na determinação do aspecto fibrótico do reparo de lesões cutâneas, Costa (2009) promoveu alguns experimentos em que a lesão cutânea incisional foi pareada com o desenvolvimento de tolerância imunológica para um antígeno não relacionado com a lesão, a ovalbumina. Essa abordagem foi conduzida porque sabia-se de antemão que no decorrer do estabelecimento da tolerância oral a um antígeno, muitos processos imunológicos sistêmicos são deflagrados, de modo que nesse momento muitos outros eventos imunológicos e inflamatórios, não relacionados ao antígeno ingerido, são “travados” concomitantemente (CARVALHO, ET AL., 1994; 1996; 1997 RAMOS ET AL. 2009). Quando a atividade imunológica foi modificada por estes protocolos de indução de tolerância, alterando-se assim a atividade linfocitária após a lesão cutânea incisional, estes autores observaram que a deposição de colágeno I e III, bem como a presença de miofibroblastos foi significativamente reduzida. Foi demonstrado que a atividade imunológica participava intimamente na determinação do aspecto fibrótico das lesões.

No que diz respeito especificamente à fibrose cardíaca, Yu, et al. (2005) demonstraram que a atividade linfocitária, dependendo de suas características, pode modular diretamente a fisiologia de fibroblastos cardíacos em cultura, promovendo uma maior síntese de colágeno. Além disso, uma atividade linfocitária que envolve a síntese de citocinas como IL-2, IL-12, IL-15, IFN- γ e TGF- β (uma atividade frequentemente denominada tipo Th₁) promoveu um aumento no entrecruzamento (cross-linking) de moléculas de colágeno no coração, aumentando assim a rigidez das fibras colágenas, bem como aumentando a rigidez ventricular, com consequências à funcionalidade do órgão.

Todos esses achados da literatura sugerem fortemente que a atividade imunológica pode influenciar a deposição de colágeno durante o reparo tecidual. Assim, ao modificar essa atividade por meio da

ingestão de extratos cardíacos previamente ao infarto, houve uma diminuição na deposição de colágeno. Futuramente, a relação direta entre linfócitos colhidos dos linfonodos mediastinais e fibroblastos cardíacos colhidos da lesão será mais extensamente abordada em nosso laboratório.

De qualquer maneira, precisa ser reforçado que essa relação entre a atividade imunológica e a dicotomia entre cicatrização *versus* regeneração parece ser muito mais generalizável que o caso específico do infarto miocárdico. Harty et al. (2002) acompanharam o desenvolvimento de sapos (*Xenopus laevis*), comparando o desenvolvimento da capacidade regenerativa, cicatricial, com o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico. A correlação encontrada foi bastante clara: sapos são perfeitamente capazes de regenerar membros amputados quando no estágio larval. Porém essa capacidade regenerativa é perdida à medida que os animais se aproximam do período de metamorfose, situação que coincide com o desenvolvimento do timo e de demais componentes do sistema imunológico. Depois da metamorfose, esses animais completamente imunocompetentes passam a reparar lesões como a amputação de um membro com a formação de um tecido cicatricial, indicando a relação entre linfócitos e fibrose.

Mas ao mesmo tempo em que a cicatrização, que depende da atividade inflamatória, parece ser um fenômeno deletério ao coração, é preciso levar em consideração que a completa abolição de processos fibroproliferativos e inflamatórios é igualmente deletéria ao coração. Uma inibição indiscriminada da inflamação/fibrose pós-infarto miocárdico, com altas doses de corticóides, por exemplo, é prejudicial ao reparo (KLONER ET AL., 1978). Devido a delicadeza dessa situação, em que a atividade imuno-inflamatória parece ser, ao mesmo tempo, indispensável, porém, indesejável, torna-se importante estabelecer quais de seus aspectos determinam um reparo restritivo ao coração e quais aspectos são importantes de serem conservados.

Nesse contexto, para se compreender melhor como a ingestão de proteínas cardíacas modifica o reparo das lesões no miocárdio, é preciso tecer uma breve discussão sobre a idéia de tolerância.

5.3 Considerações sobre a tolerância imunológica

A discussão acerca da tolerância imunológica abarca toda a imunologia e tratá-la profundamente aqui fugiria ao propósito do presente manuscrito. No entanto, para que a proposta levantada nessa tese seja plenamente exposta, é necessária uma breve advertência sobre o que se entende aqui por “tolerância”.

A denominação “tolerância imunológica” surge com experimentos pioneiros na Inglaterra e na então Tchecoslováquia que caracterizaram processos que levam à aceitação de transplantes de pele alogênica, respectivamente em camundongos (BILLINGHAM, BRENT E MEDAWAR, 1953; BRENT, 1997) e em aves (HASEK, 1953). Apesar de caracterizada em condições bastante artificiais, que envolviam a exposição de animais neonatos ou embriões a células de outros organismos, a indução deste estado de “não-reatividade específica” passou a ser um elemento crucial na formulação da teoria de Seleção Clonal alguns anos depois (BURNET 1957; 1959). Esta teoria, que domina até o presente o pensamento imunológico, fez renascer o conceito de *horror autotoxicus* proposto por Ehrlich ao início do século XX (EHRlich 1900), segundo o qual a atividade imunológica ignoraria a imunogenicidade potencial dos componentes do corpo, algo atualmente conhecido como “tolerância natural” ou “auto-tolerância”. Ademais, rupturas eventuais desta referida “auto-tolerância” dariam lugar a doenças autoimunes, hoje um conceito muito importante na medicina.

Nessa perspectiva, descrita em detalhe nos principais livros-texto de imunologia, a tolerância imunológica é vista como uma subtração, uma ausência de resposta por ignorância, simplesmente porque os linfócitos que veriam o organismo – os que surgem como auto-reativos - são expurgados do sistema durante a linfopoiese (BURNET 1959).

A literatura está repleta de exemplos que demonstram atividade de linfócitos direcionados a componentes do organismo em indivíduos saudáveis, que não foram desafiados imunologicamente (PEREIRA ET AL., 1985; COUTINHO ET AL., 1995; SCHWARTZ E COHEN ET AL., 2000). Além disso, a presença de auto-anticorpos naturais, *i.e.*, que surgem espontaneamente em indivíduos saudáveis, é também extensivamente documentada (AVRAMEAS ET AL., 2007; LACROIX-DESMAZES ET AL., 1998; LUTZ ET AL., 2009). Assim, a presença de anticorpos dirigidos a componentes do corpo (auto-anticorpos) está longe de ser uma exceção presente apenas nos distúrbios auto-imunes.

Além disso, é amplamente descrito a existência de uma interconectividade (idiotípica) entre as imunoglobulinas, de modo que todos os anticorpos (todas as imunoglobulinas) podem ser vistas como anticorpos para outros anticorpos – linfócitos direcionados para outros linfócitos (JERNE 1974, revisado por EICHMANN, 2008).

Sendo assim, uma atividade linfocitária que envolva componentes do próprio organismo é constitutivo da fisiologia do organismo. Por conseguinte, a “auto-tolerância” não deveria ser entendida como a ausência de linfócitos auto-reativos, mas sim ser entendida em termos operacionais e relacionais. Da mesma forma, a auto-imunidade com patologia não pode ser apenas descrita como presença de clones ativados contra componentes do organismo. No caso dos protocolos de tolerância estudados no presente trabalho, o que precisa ser explicado e analisado experimentalmente, não é a ausência de atividade direcionada ao próprio organismo, mas sim a estabilidade dinâmica dessa atividade (VAZ, 2011).

5.3.1 Tolerância oral

Apesar de ter sido observada cedo na história da imunologia (BESREDKA 1909; WELLS 1911), a chamada “tolerância oral” só despertou a atenção de imunologistas a partir dos anos 1970. Atualmente, há centenas de trabalhos sobre o tema, no entanto, assim como ocorre com a “auto-tolerância”, a suposição mais comum é de que a “tolerância oral” decorre da *subtração* de linfócitos reativos às proteínas previamente ingeridas como um alimento. No entanto, há vários argumentos experimentais demonstrando que a “tolerância oral” é um processo ativo, dependente de linfócitos T, que pode ser inclusive adotivamente transferido de um doador tolerante a animais receptores histo-compatíveis (CUNHA, ET AL., 2004). Dados recentes, ainda não publicados (CASTO-JUNIOR, ET AL., 2011) mostram que a tolerância oral pode promover ativação e proliferação linfocitária, além de alterar a produção de imunoglobulinas totais em órgãos linfóides sistêmicos na mesma proporção que a imunização (no sentido clássico). Isso reforça a noção de que tolerância não é ausência de atividade, mas sim uma atividade com outras características; de qualquer forma, mais similar a uma adição, que a uma subtração. Mas, que tipo de adição é essa, que não inclui a expansão de clones de linfócitos específicos para o antígeno ingerido?

Um aspecto importante, embora pouco ressaltado da “tolerância oral” é a análise de animais tornados apenas parcialmente tolerantes, ou seja, aqueles nos quais a ingestão de uma dose insuficiente do antígeno reduziu, porém não eliminou a reatividade específica. Nestes animais, esta formação “residual” de anticorpos se mostra robustamente estável, isto é, permanece nos mesmos níveis a despeito de repetidas imunizações de reforço (boosters) (VERDOLIN ET AL., 2001). Isto sugere que a ingestão de uma dose mais elevada do antígeno estabiliza a reatividade em baixos níveis, talvez pouco detectáveis, e isto seria interpretado como uma supressão da reatividade, quando na realidade se trataria ainda de uma estabilização ativa.

Esta é uma noção importante quando aplicada à “auto-reatividade” imunológica, pois nos diz que o que ocorre não é uma ausência de atividade específica dirigida a “auto-antígenos”, mas sim que esta atividade - a atividade “auto-imune” - é robustamente estável em condições fisiológicas.

Com base nessas noções já publicadas e previamente discutidas acerca do fenômeno de tolerância oral (*e.g.* VAZ ET AL., 2006), acredita-se que a ingestão de proteínas cardíacas reforça a estabilidade natural da atividade linfocitária ao tecido cardíaco. Isso seria importante para conservá-la estável após uma lesão miocárdica severa, uma condição em que a proliferação de linfócitos autorreativos sugere ser perdida. Essa referida manutenção de uma atividade imunológica estabilizada (fisiológica) após o infarto parece estar correlacionada com um reparo tecidual menos fibrótico e que impõe menores restrições à função cardíaca.

5.4 Perspectivas farmacológicas

Como mencionado na introdução deste trabalho, todas as alternativas terapêuticas voltadas para se evitar o desenvolvimento da falência cardíaca pós-infarto miocárdico concentram-se exclusivamente em modular aspectos da fisiologia dos cardiomiócitos ou em melhorar a função de “bomba” do coração (*e.g.* β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina, e antagonistas do receptor AT-1 de angiotensina II). Porém, quando se atenta ao que passa como fenômenos que resultam na fibrose ou reparo cardíaco, percebe-se que no momento não existem alternativas farmacológica que busques manejar um processo reparatório que seja menos restritivo à função cardíaca (ERTL E FRANTZ 2004).

Essa lacuna terapêutica se torna ainda mais séria quando se leva em consideração que a janela temporal para uma intervenção sobre o processo de recomposição – inflamação e fibrose – é suficientemente grande (ERTL E FRANTZ 2004).

Muitos trabalhos recentes têm proposto seriamente abordagens terapêuticas que interferem com a atividade imuno-inflamatória para pacientes pós-infarto (*e.g.* YU, ET AL., 2005). Na verdade, mesmo os antigos fármacos reconhecidos e utilizados por seus efeitos cardiovasculares, apresentam todos importantes efeitos anti-inflamatórios, os quais já se mostraram relevantes para produzir os efeitos desejados (ERTL E FRANTZ 2004).

No entanto, não são quaisquer aspectos da atividade imuno-inflamatória que podem ser modificados, pois muitos fenômenos inflamatórios são relevantes para o reparo tecidual. A inibição indiscriminada dos fenômenos inflamatórios pós-infarto obtidas através da administração de altas doses de corticóides, por exemplo, é extremamente prejudicial. Nesse contexto, recentemente têm-se visto uma corrida em busca do desenvolvimento de terapias ditas como “imunomoduladoras” ou “imunorreguladoras”, para o tratamento pós-infarto e da falência cardíaca. Nesse caminho, procura-se identificar quais as citocinas ou células deveriam ser moduladas farmacologicamente, e quais devem ser preservadas (revisado LIAO E CHEG, 2006).

O presente trabalho avança nesse sentido ao mostrar que a proliferação de linfócitos autorreativos aos componentes cardíacos é um aspecto deletério dos fenômenos imuno-inflamatórios que tomam parte nos eventos após o infarto miocárdico. Ademais, o presente trabalho indica que é possível modificar essa atividade linfocitária experimentalmente e que isso tem importantes implicações sobre o reparo tecidual cardíaco. No entanto esses dados são ainda incipientes, apesar de mostrar possíveis perspectivas. É preciso investigar ainda quais as implicações desse tipo de abordagem terapêutica sobre aspectos da farmacologia e fisiologia cardiovascular, bem como testar a possibilidade de esses efeitos encontrados com a ingestão de extratos cardíacos serem reproduzíveis com a ingestão de proteínas purificadas.

Para apresentar utilidade terapêutica, ainda que na forma de um pré-tratamento, seria interessante explorar se a estabilização da atividade imune requer a ingestão de extratos contendo todas as proteínas cardíacas ou se bastaria a ingestão de uma (ou poucas) proteínas purificadas, *e.g.* miosina cardíaca, e eventualmente, apenas os

peptídeos relevantes para a ativação de linfócitos T - que poderiam ser produtos de síntese. Sobretudo, seria importante investigar melhor a possibilidade de uma intervenção oral realizada depois da indução do infarto possa ter efeitos terapêuticos, ou se essa abordagem só tem relevância profilática. Dados preliminares encontrados no presente trabalho indicam que para ter consequências sobre a função cardíaca, as proteínas precisam ser ingeridas antes, mas não após o infarto.

5.5 Perspectivas Biológicas

A segunda implicação desses achados é mais biológica, pois ajuda a explicar como o organismo se constrói. Encontramos que o status imunológico de diferentes tecidos do organismo adulto pode ser alterado. A estabilidade da atividade linfocitária referente a um determinado aspecto do organismo (tolerância natural) pode, não apenas ser perdida nos casos de autoimunidade patogênica, como também pode ser reforçada, como nossos dados indicam. Ademais, o modo como está configurada a atividade dos linfócitos em referência ao coração é um fator que determina como o coração se reconstitui após lesão. Isto indica que o sistema imunológico toma parte fundamental na construção da forma. Abordar isso experimentalmente nos coloca na direção de responder uma das perguntas mais centrais da biologia: como os organismos se constroem? Para se compreender como surge um coração durante a embriogênese, é preciso fazer referência a processos como a gastrulação; para se compreender como o coração se remonta durante o viver adulto é preciso compreender processos que incluem a atividade linfocitária. A imunologia, neste contexto em particular, surge como uma disciplina mais relacionada à biologia do desenvolvimento que à medicina. Neste aspecto, permanece ainda por ser melhor estabelecido qual a relação entre os linfócitos que proliferam nos linfonodos mediastinais após a lesão com o microambiente cardíaco em reparo. Esses linfócitos mediastinais reativos ao coração migram para o sítio da lesão? Quais fenótipos de linfócitos participam desta infiltração? Que atividades estabelecem no coração? De que maneira essa atividade linfocitária interfere com a fisiologia dos fibroblastos cardíacos, dos leucócitos mononucleares infiltrados, ou mesmo com a fisiologia dos cardiomiócitos? Essas são questões importantes a responder que pretendemos aprofundar na continuidade dessa investigação.

Por fim, gostaria de apenas trazer (e deixar) uma discussão levantada por Waddington (1956). Suponhamos que o que está representado na figura 14 seja: um coração íntegro (esquerda), e um

extrato de coração (direita). Todas as moléculas encontradas num coração íntegro estão também no tubo de ensaio, nas mesmas quantidades, porém sem configurar-se como coração. Torna-se claro que a diferença entre essas duas situações não reside nos componentes estruturais cardíacos, mas na trama de relação que se estabelece com eles. Mais ainda, residem no processo de geração e manutenção dessa configuração de relações, em uma estabilidade dinâmica. Para entender como se constrói ou reconstrói um coração, é preciso compreender quais processos geram essa trama de relações em particular, e não simplesmente quais moléculas ou células o constituem. Citocinas, fatores de crescimento ou células progenitoras cardíacas seguramente tomam parte importante nessa situação, mas o que é preciso entender é a condição sistêmica que dá sentido aos componentes em particular. Compreender isso é fundamental para responder sobre como um coração se constrói e reconstrói.

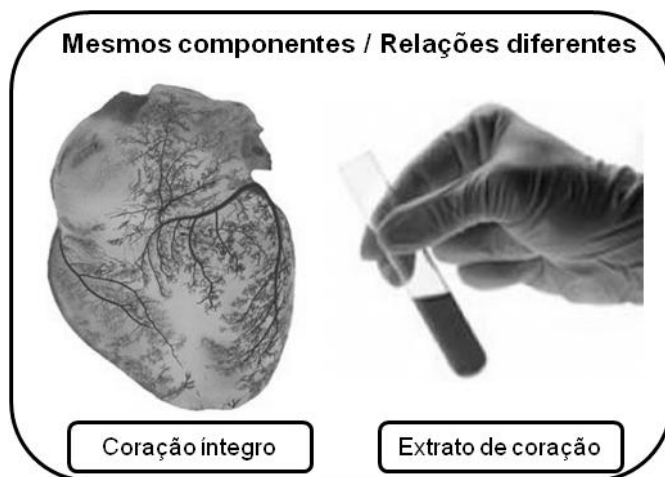


Figura 14: O que diferencia o coração íntegro de um tubo de ensaio contendo todos os seus componentes é sua organização, uma trama de relações conservada dinamicamente.

Referências Bibliográficas

AUSONI S, SARTORE S. From fish to amphibians to mammals: in search of novel strategies to optimize cardiac regeneration. *J Cell Biol*, **184**: 357-364, 2009.

AVRAMEAS S, TERNYNCK T, TSONIS I, LYMPERI PL. Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *J Autoimmun*, **29**: 213-18, 2007.

Besredka A. De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique. *Ann Ins. Pasteur*, **23**: 166-174, 1909.

BEZNAK M. Hemodynamics during the acute phase of myocardial damage caused by isoproterenol. *Can J Biochem Physiol*, **40**:25-30, 1962.

BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, **172**: 603 – 606, 1953.

BRENT L. The discovery of immunological tolerance. *Human Immunology*, **52**: 75-81, 1997.

BUJAK M, FRANGOIANNIS NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Card Res*, **74**: 184-195, 2007.

BURNET FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science*, **20**:67-9, 1957.

BURNET FM. *The Clonal selection theory of acquired immunity*. Cambridge: Cambridge University Press, 1959.

CAMPOS EC, ROMANO MM, PRADO CM, ROSSI AM. Isoproterenol induces primary loss of dystrophin in rat hearts: correlation with myocardial injury. *Int J Exp Pathol*, **89**: 367-81, 2008.

CASTRO-JUNIOR AB, HORTA B, SANTOS AC, CUNHA AP, FARIA AM, VAZ NM. Oral tolerance correlates to high levels of lymphocyte activity. Submetido para publicação.

CARVALHO CR, SOUZA AV, VERDOLIN BA, VAZ NM. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J of Immunol*, **39**: 533-538, 1994.

CARVALHO CR, Vaz NM. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scand J Immunol*, **43**: 613-618, 1996.

CARVALHO CR, VERDOLIN BA, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol*, **45**: 276-281, 1997.

CHAPPEL CI, RONA G, BALAZS T, GAUDRY R. Severe myocardial necrosis produced by isoproterenol in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **122**: 123-128, 1959.

CHENG X, LIAL YH, LI B. Changes of rat lymphocyte proliferation and cytotoxic activity after myocardial infarction in vitro. *Chin J Pathophysiology*, **21**: 1848-1850, 2005.

CONDE AA, STRANSKY B, FARIA AC, Vaz NM. Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen. *Braz J Med Biol Res*, **31**: 377-380, 1998.

COSTA RA. *Efeitos sistêmicos da tolerância oral interferem no reparo de lesões cutâneas em camundongos*. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009

COUTINHO A, KAZATCHKINE MD, AVRAMEAS S. Natural autoantibodies. *Current Opinion Immunology*, **7**: 812-18, 1995.

CUNHA AP, OLIVEIRA RP, CASTRO JUNIOR AB, VAZ NM, CARVALHO CR. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. *Cellular Immunology*, **258**: 152–160, 2008.

De SCHEERDER I, VANDEKERCKHOVE J, ROBBRECHT J. Post-cardiac injury syndrome and an increased humoral immune response against the major contractile proteins (actin and myosin). *Am J Cardiol*, **56**:631–3, 1985.

De SCHEERDER I, De BUYZERE ML, De LANGHE JR, CLEMENT DL, WIEME RJ. Anti-myosin humoral immune response following cardiac injury. *Autoimmunity*, **4**:51–8, 1989.

EHRlich P. On immunity, with special reference to cell life. *Proceedings of the Royal Society*, **66**: 424-448, 1900.

EICHMANN, K. *The network collective: the rise and fall of a scientific paradigm*. Birkhäuser, Basel, Suíça, 2008.

ERTL G, FRANTZ S. Healing after myocardial infarction. *Card Res*, **66**: 22-32, 2005.

FARIA AMC, WEINAR HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* **206**: 232-259, 2005.

FARIA AM, WEINER HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Develop Immunol*, **13**: 143-57, 2006.

FIXLER R, SHIMONI Y, HASSIM D, ADMON D, RAZ S, YAROM R, HASIN Y. Physiological changes induced in cardiac myocytes by cytotoxic lymphocytes: an autoimmune model. *J Mol Cell Cardiol*, **26**: 351-360, 1994.

FRANGOIANNIS NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research*, **58**: 88-111, 2008.

FRANTZ FW, BETTINGER DA, HAYNES JH, JOHNSON DE, HARVEY KM, DALTON HP, YAGER DR, DIEGELMANN RF, COHEN IK. Biology of fetal repair: The presence of bacteria in fetal wounds induces an adultlike healing response. *J Pediat Surg*, **28**:428-433, 1993.

GARRY DJ, MARTIN CM. Cardiac Regeneration: Self-service at the pump. *Circulation Research*, **95**: 852-854, 2004.

HANSON DG, VAZ NM, MAIA LCS, HORNBROOK MM, LYNCH JL, ROY, CA. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **55**: 526-532, 1979.

HARTY M, NEFF AW, KING MW, MESCHER AL. Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev Dyn*, **226**: 268-279, 2003.

JERNE NK. Towards a network theory of the immune system, *Annals of Immunology*, **125C**: 373-92, 1974.

KUSHNER I, KAPLAN MH. Antigenic analysis of extracts of human heart tissue: cardiac antigens with limited distribution to other organs. *J Immunol*, **99**: 526-533, 1967.

KING ESJ. Regeneration in cardiac muscle. *Brit Heart J*, **2**: 155-164, 1939.

KLONER RA, FISHBEIN MC, LEW H, MAROKO PR, BRAUNWALD E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*, **57**: 56-64, 1978.

KUBO H, JALEEL N, KUMARPELI A, BERETTA RM, BRATIMOS G, SHAN X, WANG H, HOUSER S, MARGULIES KB. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts. *Circulation*, **118**: 649-657, 2008.

LACROIX-DESMAZES S, KAVERI SV, MOUTHON L, AYOUBA A, MALANCHÈRE E, COUTINHO A, KAZATCHKINE MD. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods*, **6**:117-37, 1998

LEPILINA A, COON NA, KIKUCHI K, HOLDWAY JE, ROBERTS RW, BURNS CG, POSS KD. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, **127**: 607-619, 2004.

LESSOF M. Immunological reactions in heart disease. *Brit Heart J*, **40**: 211-214, 1978.

LIAO Y, CHENG X. Autoimmunity in myocardial infarction. *Int J Cardiol*, **112**: 21-26, 2006.

LUTZ HU, BINDER CJ, KAVERI S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trend Immunol*, **30**:43-51, 2009.

MAISEL A, CESARIO D, BAIRD S, REHMAN J, HAGHIGHI P, CARTER S. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction. *Circ Res*, **82**: 458-63, 1998.

MARSI C, CHANDRASHEKHAR Y. Apoptosis: a potentially reversible, meta-stable state of the heart. *Heart Fail Rev*, **13**:175-179, 2008.

MATZINGER, P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol*, **8**: 11-13, 2007.

MCCALLION RL, FERGUSON MWJ. Fetal wound healing and the development of anti-scarring therapies for adult wound healing. In: CLARCK RAF, ed. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2a ed., New York: Plenum Press, 561–600, 1995.

MELGUIZO C, PRADOS J, VELEZ C, ARANEGA AE, MARCHAL JA, ARANEGA A. Clinical significance of antiheart antibodies after myocardial infarction. *Jpn Heart J*, **38**:779–86, 1997.

MESCHER AL, NEFF AW. Limb regeneration in amphibians: immunological considerations. *Development & Embriology*, **6**: 1-11, 2006.

MESSINA E, ANGELIS L, FRATI G, MORRONE S, CHIMENTI S, FIORDALISO F, SALIO M, BATTAGLIA M, LATRONICO MVG, COLLETA M, VIVARELLI E, FRATI L, COSSU G, GIACOMELLO A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Research*, **95**: 911-921, 2004.

MILEI J, RAPAPORT M. Localization by autoradiography of tritiated isoproterenol in infarct-like lesions of rat myocardium. *Am Heart J*, **92**: 351-355, 1978.

MILL JG, MILANEZ MC, STEFANON I. Fisiopatologia das alterações estruturais e funcionais do coração após o infarto do miocárdio. In: TIBIRIÇÁ E. *Fisiopatologia em medicina cardiovascular*. RevinteR Ltda. Rio de Janeiro, 2001.

MOHAN P, BLOOM S. Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovasc Pathol*, **8**:255-261; 1999.

MOWAT AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, **3**: 331-341, 2003

PANG H, LIAO YH, TU YS, DONG J, LU Q . Effect of anti-cardiac myosin antibody on prognosis of patients with acute myocardial infarction. *J Tongji Med Univ*, **20**:46–8, 2000.

PEREIRA P, LARSSON E-L, FORNI L, BANDEIRA A, COUTINHO A. Natural effector T lymphocytes in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 7691-7695, 1985.

PICK R, JALIL J E, JANICKI J S, WEBER K T. The fibrillar nature and structure of isoproterenol-induced myocardial fibrosis in the rat. *Am J Pathol*. **134**: 365-371, 1989.

RAMOS GC, RODRIGUES CM, AZEVEDO GM, PINHO V, CARVALHO CR, VAZ NM. Cell-mediated immune responses to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology*, **126**:354-62, 2009.

RONA G, CHAPPEL CL, BALAZS T, GAUDRY R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch Pathol*. **67**: 443-455, 1959.

ROSE NR, BEISEL KW, HERSKOWITZ A, NEU N, WOLFGRAM LJ, ALVAREZ FL, TRAYSTMAN MD, CRAIG SW. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. *Ciba Found Symp*, **129**:3–24, 1987.

SCHWARTZ M, COHEN IR. Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today*, **21**:265-8, 2000.

SICARD RE. Differential inflammatory and immunological responses in tissue regeneration and repair. *Ann NY Acad Sci*, **961**: 368-371, 2002.

SINGAL PL, DHILLON KS, BEAMISH RE, DHALLA NS. Protective effect of zinc against catecholamine-induced myocardial changes electrocardiographic and ultrastructural studies. *Lab Invest*, **44**: 426-433, 1981.

SKRZYPIEC-SPRING M, GROTHUS B, SZELĄG A, SCHULZ, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Met*, **55**: 113–126, 2007.

TODD CW, TODD NR, GUIMARAES AC. Do Lymphocytes from chagasic patients respond to heart antigens? *Infection and immunity*, **40**: 832-835, 1983.

VARDA-BLOOM N, LEOR J, OHAD DG, HASIN Y, AMAR M, FIXLER R, BATTLER A, ELDAR M, HASIN D. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill normal myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*, **32**:2141–9, 2000.

VAZ NM, MAIA LC, HANSON DG, LYNCH JM. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*, **60**:110-115, 1977.

VAZ NM, RAMOS GC, PORDEUS V, CARVALHO CR. The conservative physiology of the immune system. A non-metaphoric approach to immunological activity. *Clin Dev Immunol*, **13**:133-42, 2006.

VAZ NM, Uma breve história das certezas Imunológicas. in: MPODOZIS J, VAZ NM, RAMOS G, BOTELHO JF. *Onde está o organismo? Derivas e outras histórias em Biologia e imunologia*. EdUFSC, Florianópolis, 2011.

VERDOLIN BA, FICKER SM, FARIA AMC, VAZ NM, CARVALHO CR. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz J Med Biol Res*. **34**: 211-219, 2001.

WANG ZH, LIAO YH, TU YS, LI S, WANG J, TU Y. Myosin-induced autoimmune myocarditis in Balb/c mice. *J Tongji Med Univ*, **19**:112-4, 1999.

WANG ZH, LIAO YH, DONG JH. Experimental study of cardiac myosin-induced autoimmune cardiomyopathy. *Chin J Cardiol*, **31**:937-40, 2003.

WEBER KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*, **13**:1637- 52, 1989.

WELLS HG. Studies on the chemistry of anaphylaxis.III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg. *J Inf Dis*, **9**: 147-171, 1911.

WHITBY DJ, FERGUSON MWJ. Immunolocalization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol*, **47**: 2207-2215, 1991.

YOSHINO S. Antigen-induced arthritis in rats is suppressed by the inducing antigen administered orally before, but not after immunization. *Cell Immunol*, **163**:55–58, 1995.

YU Q, WATSON RR, MARCHALONIS JJ, LARSON DF. A role for T lymphocytes in mediating cardiac diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**: H643-H655, 2005.

ZHANG J, CHENG X, LIAO YH, LU B, YANG Y, LI B, GE H, WANG M, LIU Y, GUO Z, ZHANG L. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*, **19**:13–21, 2005